

ردیابی *Polymyxa betae* در ریشه چغندر قند با استفاده از روش های میکروسکوپی، سرولوژیکی و مولکولی

فاطمه حسن زاده^{1*}، سعید رضائی¹، سید باقر محمودی²، پیمان نوروزی²، محمدرضا صفرنژاد³، حسین صفرپور^{5,4}

1- دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیماری شناسی گیاهی تهران

2- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند کرج

3- استادیار موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

4- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، کرج

5- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دانشکده علوم پزشکی، تهران

تاریخ دریافت: 1390/4/15، تاریخ پذیرش: 1391/7/25

چکیده

به منظور طراحی یک سیستم تشخیصی و سنجش دقیق *P. betae* در چغندر قند سه روش میکروسکوپی، سرولوژیکی و مولکولی روی یک رقم حساس به عامل و ناقل بیماری ریزومانایای چغندر قند با یکدیگر مقایسه شدند. ابتدا رقم حساس رجینا در مخلوط مساوی از خاک آلوده و کمپوست در گلخانه کشت شد. پنج هفته پس از کاشت، ریشه گیاهان در محلول اسید فوشین - لاکتوفنل رنگ آمیزی شد. آزمون الایزا با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب گلوکاتایون - اس - ترانسفراز *P. betae* بهینه سازی شد. برای این کار عصاره ریشه بوته های سالم و آلوده تهیه و در آزمون DAS-ELISA استفاده شد. حضور *P. betae* در ریشه گیاهان با استفاده از تکثیر هم زمان منطقه اختصاصی rDNA پلاسمودیوفورومیست ها و آغازگر اختصاصی آن ردیابی شد. وجود سیستم سورهای *P. betae* در ریشک های بوته هایی که در خاک آلوده بودند مشاهده شد. نتایج آزمون الایزا بوته های سالم و آلوده را از یکدیگر تفکیک نمود. میانگین جذب نوری در طول موج 405 نانومتر در بوته های سالم 0/126، بوته های آلوده 0/75، پروتئین BSA (کنترل منفی) و GST (کنترل مثبت) به ترتیب 0/11 و 2/45 بود. واکنش PCR دو قطعه 454 و 170 جفت باز را در نمونه های آلوده مربوط به منطقه rDNA و نشانگر اختصاصی از *P. betae* را تکثیر کرد. به این ترتیب به نظر می رسد برای ردیابی سریع *P. betae* در چغندر قند و سایر میزبان های آن می توان از روش مبتنی بر PCR و برای ارزیابی مقاومت ژرم پلاسم چغندر قند از آزمون الایزا بهره برد.

واژه های کلیدی: ریزومانیا، گلوکاتایون - اس - ترانسفراز، الایزا، پی سی آر، ITS.

مقاوم، بهترین راه مبارزه با بیماری ریزومانیا محسوب می شود (Rush et al., 2006). اغلب ارقام مقاوم به ریزومانیا، که در سراسر جهان کشت می شوند دارای مقاومت تک ژنی به ویروس عامل بیماری هستند. شکستن مقاومت تک ژنی توسط سویه هایی از ویروس از اروپا و آمریکا گزارش شده است (Liu et al., 2007). به منظور ایجاد مقاومت پایدار به بیماری ریزومانیا، استفاده از ژنوتیپ های مقاوم به *P. betae* و نیز ویروس عامل بیماری در تهیه رقم مقاوم پیشنهاد شده است (Asher et al., 2008) تا به این وسیله در انتقال و ورود ویروس BNYVV به گیاه و تکثیر آن در گیاه اختلال ایجاد شود. مقاومت طبیعی در برابر این پروتیستا در برخی گونه های وحشی مانند *Beta patellaris* مشاهده شده است. در این گونه، *P. betae* پس از ایجاد آلودگی اولیه، قادر به تکمیل چرخه زندگی خود نمی باشد (Barr et al., 1995). این وضعیت به عنوان عاملی موثر در جهت جلوگیری از آلودگی به ریزومانیا کافی به نظر می رسد (Paul et al., 1992).

ارزیابی مقاومت ژرم پلاسما چغندر به *P. betae* نیاز به یک سیستم تشخیص و سنجش دقیق دارد تا بتوان در شرایط آلوده، گیاهانی که دارای میزان زادمایه پایینی از ناقل می باشند را شناسایی نمود.

بررسی های ابتدایی برای شناسایی منابع ژنتیکی مقاومت به ناقل، مبتنی بر شمارش

پلاسمودیوفورید *Polymyxa betae* انگل اجباری خاکزی از رده پلاسمودیوفورومیست ها¹ است که بیشتر به گیاهان خانواده اسفناجیان محدود می شود. این ناقل ویروس های زردی نکروتیک رگبرگ چغندر²، ویروس خاکزاد چغندر³، ویروس موزائیک خاکزاد چغندر⁴ و ویروس Q چغندر⁵ می باشد (Drycott, 2006). ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر عامل بیماری ریشه گنایی (ریزومانیا) در چغندر³ است (Rush et al., 2003). در حال حاضر ریزومانیا مهمترین بیماری چغندر³ محسوب می شود (Lenhofers et al., 2006) و سالانه خسارت شدیدی به این محصول صنعتی وارد می سازد. به طور معمول، این بیماری منجر به کاهش عملکرد ریشه به میزان 50 درصد و یا بیشتر شده (Henry, 1996). ولی با این وجود، از بین رفتن کامل محصول نیز گزارش شده است (Lamey, 1992). اسپورهای مقاوم *P. betae* قادرند تا 25 سال در خاک باقی بمانند و به راحتی توسط آب آبیاری، ادوات کشاورزی و باد به مناطق مجاور منتقل می شوند (Rush et al., 2003). با توجه به خاکزی بودن ناقل بیماری، کاربرد روش های زراعی، شیمیایی و بیولوژیکی در مبارزه با آن چندان موفقیت آمیز نبوده است، لذا استفاده از ارقام

¹ - Plasmodiophoromycetes

² - Beet necrotic yellow vein virus

³ - Beet soil born virus

⁴ - Beet soil born mosaic virus

⁵ - Beet virus Q

جمعیت‌های در حال تفرق، دو مکان ژنی مقاومت به *P. betae* را به نام‌های pb1 و pb2 روی کروموزوم‌های شماره 4 و 9 در چغندر قند شناسایی کرد (Asher et al., 2008). ردیابی *P. betae* با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و مبتنی بر اسید نوکلئیک در بوته‌های آلوده به صورت کیفی توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از نشانگرهای اختصاصی DNA ناقل (Mutasa et al., 1993) و به صورت کمی توسط Real-Time PCR انجام شده است (Kingnorth et al., 2003a).

در ایران ردیابی *P. betae* بر اساس مشاهدات میکروسکوپی بوده است (Jalali et al., 2009). در پژوهش حاضر، ردیابی *P. betae* در ریشه گیاهان با استفاده از روش‌های میکروسکوپی، سرولوژیکی و مولکولی مورد مقایسه قرار گرفت. آزمون الیزا با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه پروتئین نو ترکیب گلو تاتیون - اس - ترانسفراز *P. betae* جهت کمی نمودن میزان آلودگی به *P. betae* در ریشه گیاهان به منظور غربال بوته‌های مقاوم بهینه سازی شد. همچنین ردیابی سریع *P. betae* در ریشه‌های گیاهان آلوده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی منطقه rDNA پلاسمودیوفورومیست‌ها و آغازگر اختصاصی *P. betae* بررسی شد.

اسپوره‌های استراحتی در ریشه‌های فرعی بوته‌های چغندر قند با مشاهده مستقیم توسط میکروسکوپ معکوس بود (Paul et al., 1992). بر این اساس مقاومت به *P. betae* در گروه Procumbentes (Paul et al., 1992; Barr et al., 1995) و Corollinae (Paul et al., 1992) گزارش شد. در این گروه‌ها مقاومت به *P. betae* با کاهش در غلظت ویروس در ریشه‌چه‌های بوته‌ها در ارتباط بوده است. مطالعات ژنتیک مقاومت به *P. betae* در لاین‌های مونوسومیک چغندر قند بر اساس شمارش اسپوره‌های استراحتی در ریشه‌ها با استفاده از میکروسکوپ، نشان داد که ژن‌های مقاومت به *P. betae* روی کروموزوم‌های 4 و 8 در گروه *B. procumbentes* (Paul et al., 1992) و کروموزوم‌های 4/1 و 8/1 در گروه *B. patellaris* قرار دارد (Mesbah et al., 1997). آنتی سرم پلی کلونال تهیه شده در برابر پروتئین گلو تاتیون - اس - ترانسفراز ¹ *P. betae* (Kingnorth et al., 2003b) غربال رأس شمارهایی² از *B. vulgaris* ssp. *maritima* را توسط آزمون DAS-ELISA فراهم نمود. مقاومت به *P. betae* از *B. maritima* به لاین‌های چغندر قند از طریق تلاقی کلاسیک انجام و نتایج نشان داد که سطح آلودگی به ویروس در لاین‌های چغندر قند کاهش یافته است. مطالعات بیشتر با استفاده از نشانگرهای مولکولی در

¹ - Glutathione-S-transferase

² - Accession

مواد و روش ها

ردیابی میکروسکوپی *P. betae* در ریشه چغندر قند

بدین منظور، ابتدا از خاک مزرعه آلوده به بیماری ریزومانیاز فارس نمونه برداری شد. خاک آلوده با نسبت مساوی با کمپوست استریل مخلوط شد و بوته های چهار هفته ای رقم حساس رجینا به آن انتقال یافتند. پس از پنج هفته ریشه های مربوط به هر نمونه به مدت 10 دقیقه درون آب قرار گرفتند تا بقایای خاک کاملاً از آنها جدا گردد. سپس ریشه ها در محلول اسید فوشین- لاکتوفنل پنج درصد به مدت یک دقیقه جوشانده شدند. از هر نمونه ریشه، 10 قطعه 0/5 سانتی متری جدا شد و بر روی لام میکروسکوپ قرار گرفت. سیستم سورهای قارچ توسط میکروسکوپ Nikon مدل E800 با بزرگنمایی 40X ردیابی شدند (Mesbah et al., 1997).

از چاهک های پلیت الیزا در رقت های 1/500، 1/1000 و 1/2000 و به میزان 100 میکرولیتر اضافه شد. مرحله بلاک کردن با skim milk-PBS دو درصد به مدت 2 ساعت در 37 °C انجام گرفت. سپس ریشه های آلوده و سالم چغندر قند با استفاده از بافر عصاره گیری (شامل توئین 20، PBS و PVP) عصاره گیری شدند. یکصد میکرولیتر از عصاره هر نمونه به همراه شاهد مثبت و منفی در چاهک ها بارگذاری شد و پلیت به مدت یک شب در 4 °C قرار گرفت. پس از شست و شوی پلیت با PBS-T، آنتی بادی چند همسانه ای نشان دار در رقت 1 به 1000 اضافه شد و پلیت برای مدت سه ساعت در 37 °C قرار گرفت. پس از شست و شوی سوبسترای پارانیتر و فیل فسفات به چاهک ها اضافه و واکنش رنگی بعد از یک ساعت در طول موج 405 نانومتر توسط دستگاه قرائت گر الیزا اندازه گیری شد.

ردیابی مولکولی *P. betae* در ریشه چغندر قند

ابتدا استخراج DNA از ریشه های خشک آلوده و سالم (شاهد) با استفاده از روش (Mutasa et al., 2000) با تغییرات اندکی انجام شد. سپس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به دو ناحیه از DNA ی پروتستای *P. betae* (جدول 1) به دو صورت جداگانه و همزمان بهینه سازی شد. واکنش Duplex- PCR در حجم 20 میکرولیتر شامل 2

ردیابی سرولوژیکی *P. betae* در ریشه چغندر قند

در این روش با استفاده از آنتی بادی اختصاصی بر علیه پروتئین نو ترکیب GST پلاسمودیوفورید *P. betae* جدایه زرقان فارس (تهیه شده توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج)، آزمون الیزا به روش ساندویچ دو طرفه (DAS- ELISA) مطابق روش صفرپور و همکاران (Safarpour et al., 2012) با تغییرات اندکی انجام شد. آنتی بادی غیر نشان دار به هر یک

انجام شد. در این آزمون از پروتئین‌های GST نوترکیب و BSA به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی با غلظت 10 میکروگرم در میلی لیتر استفاده شد. تفکیک بوته های چغندر قند آلوده به *P. betae* از بوته های سالم پس از اندازه گیری میزان جذب نوری (OD) بوته های سالم و محاسبه حد استاندارد (Delfosse et al., 2000) مؤید نتایج حاصل از مراحل روش های میکروسکوپی و مولکولی بود. میزان جذب نوری نمونه ها در طول موج 405 نانومتر در شکل 2 آمده است. همچنانکه در شکل 2 مشخص است میزان جذب نور در شاهد مثبت (پروتئین نوترکیب GST) از همه بیشتر و 22 برابر شاهد منفی است. میانگین جذب نوری بوته های آلوده 0/75 بوده است.

تکثیر همزمان منطقه rDNA و منطقه اختصاصی

P. betae توسط PCR

پس از بهینه سازی اجزای واکنش PCR به صورت جداگانه برای هر دو منطقه تکثیری، PCR همزمان دو منطقه تکثیری نیز باندهای مورد نظر را تکثیر کرد و آلودگی ریشه ها به *P. betae* تایید شد. باند منطقه rDNA شامل ITS1, 5.8s, ITS2 در *P. betae* برابر 454 bp بود و باند نشانگر اختصاصی *P. betae* شامل 170 bp بود (شکل 3).

میکرولیتر بافر PCR (10X)، 2 میکرولیتر dNTPs (MgCl₂ 25mM)، 1/6 میکرولیتر (10mM)، 1 میکرولیتر از هر چهار آغازگر Taq DNA (30ng)، 0/2 میکرولیتر از آنزیم Polymerase، 1 میکرولیتر DNA الگو و 9/2 میکرولیتر آب مقطر انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل 5 دقیقه در 95 °C و 37 چرخه، 95 ° به مدت 40 ثانیه، 55 °C برای 1 دقیقه، 72 °C به مدت 1 دقیقه و مرحله گسترش نهایی در 72 °C به مدت 10 دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد همراه با بافر TBE (1X) و با ولتاژ 100 الکتروفورز شد.

نتایج

مشاهدات میکروسکوپی

در ریشه های فرعی بوته های چغندر قند بعد از پنج هفته که در خاک آلوده بودند اسپوره های مقاوم *P. betae* مشاهده شد (شکل 1). اسپوره های استراحتی به صورت ردیف های 2 تا 5 تایی با فراوانی زیاد از 5 تا 200 عدد در سلول های بافت اپیدرم مشاهده شدند. دستجات اسپوره های استراحتی *P. betae* در ریشه بوته هایی که در خاک سالم کشت شده بودند ردیابی نشد.

نتایج الایزا

آزمون الایزا با استفاده از آنتی بادی تولید شده بر علیه جدایه ایرانی *P. betae* تا رقت 1/2000

جدول 1- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Duplex-PCR.

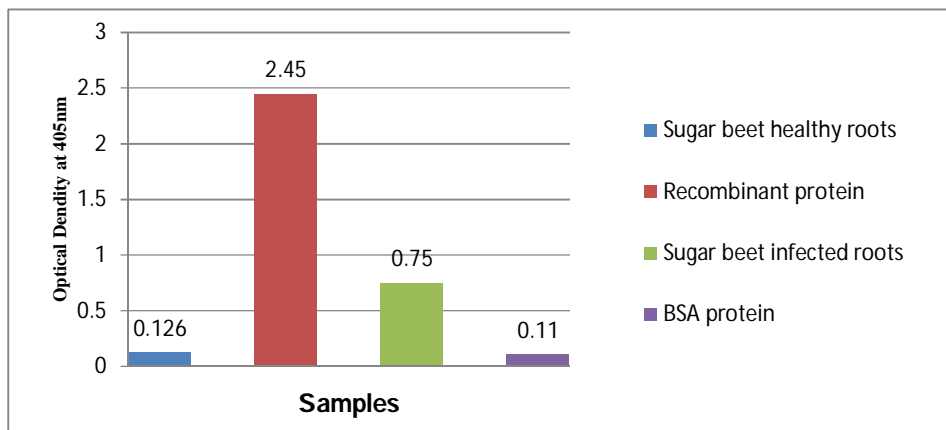
Table 1- The sequences of primers used in Duplex PCR.

ناحیه ژنی Gene Region	توالی آغازگرها Primers sequence	محصول PCR PCR products (bp)	منبع Reference
ITS1, 5.8s, ITS2	Psp1: 5'TAGACGCAGGTCATCAACCT- 3' Psp2rev:5'-GGGCTCTCGAAAGCGCAA- 3'	454	Legreve, A(2003)
<i>P. betae</i> repetitive <i>EcoRI</i> like fragment	PB4: 5'- CAAAGGCCTGAAATCATCTAAC-3' PB4rev: 5'- GATGGCCCAATTCCTTACAC-3'	170	Meunier, A(2003)



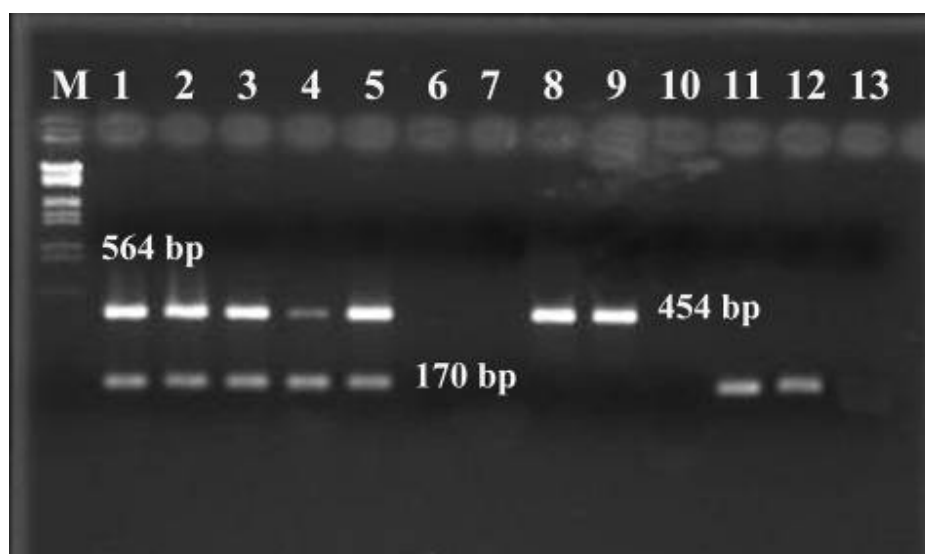
شکل 1- اسپوره‌های مقاوم *P. betae* به صورت تجمعی (Cystosori).

Figure 1- Resting spores of *P. betae* in form of Cystosori.



شکل 2- میزان جذب نور عصاره ریشه گیاهان حاوی و فاقد *P. betae* در آزمون الایزا. همه نمونه‌ها در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند.

Figure 3- Optical Density of sap root extracts of the plants containing *Polymyxa betae* and free of *P. betae* in ELISA test. All of samples were tested in three replications.



شکل 3- الگوی باند اختصاصی 454 bp منطقه ریپوزومی و 170 bp اختصاصی *P. betae* در ریشه های آلوده به آن. ردیف 1-5 تکثیر همزمان دو باند اختصاصی *P. betae* در نمونه های آلوده، ردیف 6 نمونه شاهد سالم، ردیف 7 کنترل منفی، ردیف 8-9 تکثیر جداگانه منطقه ریپوزومی، ردیف 10 کنترل منفی، ردیف 11-12 تکثیر جداگانه منطقه اختصاصی *P. betae*. ردیف 13 کنترل منفی و M نشانگر اندازه استاندارد.

Figure 4- Banding pattern of specific fragments of 454bp and 170bp relating to r DNA and specific regions of *P. betae* in infected roots. Lane(1-5): Simultaneous amplification of two specific band of *P. betae* in infected samples. Lane 6: Health control, lane 7: Negative control, lane 8-9: Amplification of r DNA region, lane 10: Negative control, lane 11-12: Amplification of specific region of *P. betae*, lane 13: Negative control and M: standard molecular weight.

ناقل به گیاه می تواند از جمله راهکارهای کاهش گسترش بیماری در مزارع و مناطق چغندرکاری به حساب آید (McGrann *et al.*, 2009).

علاوه بر این شناسایی مزارع حاوی و یا فاقد *P. betae* و میزبان های دیگر ناقل از جمله علف های هرز مزارع در مدیریت بیماری اهمیت ویژه ای دارد (Mohanna *et al.*, 2008). جهت ردیابی *P. betae* در مزارع، میزبان ها و یا ژرم پلاسما مقاوم نیاز به روش های ردیابی دقیق و سریع آن می باشد. تا به حال روش های مختلفی از

بحث

بیماری ریزومانیا مهمترین بیماری چغندر قند در ایران (Darabi *et al.*, 2003) و دنیا (Pavli *et al.*, 2011) می باشد. محدودیت دسترسی به منابع ژنتیکی برای ایجاد مقاومت علیه ویروس عامل این بیماری از جمله مهمترین چالش ها در مقابله با این بیماری است (Lie *et al.*, 2007). با توجه به اینکه انتقال طبیعی این بیماری منحصراً با پلاسما دیوفورید *P. betae* صورت می پذیرد (Vector-lubicz *et al.*, 2007)، جلوگیری از ورود

بیمارگر در ریشه گیاهان مورد بررسی قرار گیرد. بررسی میکروسکوپی، مورفولوژی اسپوره‌های استراحتی *P. betae* بر اساس رنگ آمیزی ریشه چه‌ها و مشاهدات میکروسکوپی با نتایج سایر محققین (Izadpanah et al., 1996; Mesbah et al., 1997; Jalali et al., 2009) مطابقت داشت. تعداد دسته‌های اسپوره‌های استراحتی مشاهده شده *P. betae* به اشکال مختلف نامنظم (irregular clusters) و چند لایه‌ای (Multiple) در ریشه چه‌های چغندر قند مشاهده شد. هر چند اسپوره‌های استراحتی جنس‌های پلاسمودیوفورومیست خصوصیات مشخصی ندارند اما ترتیب و آرایش آن‌ها در تفکیک جنس‌ها مفید است (Braselton, 1995). در دیگر جنس‌های این خانواده اسپوره‌های استراحتی به صورت گوی‌های تهی، توده‌های اسفنجی و یا منفرد دیده می‌شود (Dick, 2001). استفاده از میکروسکوپ نوری جهت شناسایی پلاسمودیوفورید *P. betae* هر چند روشی ساده برای مشاهده فرم پایدار ناقل است اما به دلیل پاره‌ای از محدودیت‌ها از جمله ندیدن فرم‌های نابالغ و کوچک شبه قارچ و عدم تمایز بین زئوسپورانژیوم‌ها و اسپوره‌های مقاوم با سایر قارچ‌ها غیر قابل اطمینان و زمان‌بر است.

پروتئین گلوکوتایون - اس - ترانسفراز بعنوان یک فرآورده قارچی موجود در تمامی حالت رشدی از قبیل زئوسپور، اسپورانژیوم و اسپوره‌های استراحتی که یک ایمونوژن قوی نیز می‌باشد، می-

قبیل هیبریداسیون DNA (Mutasa et al., 1993)، PCR کمی¹ (Ward et al., 2004) و روش‌های سرولوژیکی² (Kingsnorth et al., 2003b) برای تشخیص، بررسی کمی میزان آلودگی و ارزیابی مقاومت به پروتستای *P. betae* استفاده شده است. روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون DNA، قابلیت شناسایی *P. betae* در گیاه را دارا می‌باشند (Mutasa et al., 1993)، اما این روش‌ها به تنهایی قادر به تعیین میزان کمی آن در گیاه نیستند. به علاوه، این روش‌ها نمی‌توانند زنده یا مرده بودن *P. betae* را تعیین کنند.

این وضعیت برای آلودگی با پلاسمودیوفورید *P. betae* حیاتی است، زیرا زئوسپورها قادر به ایجاد آلودگی اولیه در ریشه‌های گیاهان مقاوم و حساس هستند (Barr et al., 1995). روش‌های سرولوژیکی امروزه به صورت متداول برای شناسایی عوامل بیماریزای گیاهی و بررسی میزان زاد مایه عوامل بیماریزا مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش‌ها قابلیت ارزیابی کمی و کیفی پروتئین‌ها را داشته و نیازی به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی ندارند (Mutasa et al., 2000).

در این تحقیق سعی شد تا با استفاده از سه روش میکروسکوپی، سرولوژیکی و مولکولی حضور و یا عدم حضور و همچنین میزان کمی

¹ - Quantitative PCR

² - Serological method

ریشه ها در زمان شستشو که هم ویروس و هم ناقل در آنجا حضور دارند با مشکل مواجه است. بنا براین ردیابی مولکولی *P. betae* در ریشه های فرعی علف های هرز به راحتی امکان پذیر است. در این تحقیق نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *P. betae* در نمونه های آلوده قطعه ای با طول 170bp را تکثیر کرد که با نتایج Meunier *et al.* (2003) مطابقت داشت. همچنین آغازگرهای مربوط به ناحیه rDNA پلاسمودیوفورومیست ها در نمونه های آلوده به *P. betae* قطعه ای به طول 454bp را تکثیر کرد که با نتایج Legreve *et al.* (2003) یکسان بود. روش های مولکولی هر چند روش هایی با حساسیت بالا در تشخیص بیمارگر ها محسوب می شوند اما قادر به کمی کردن بیمارگر ها نیستند. روش کمی Real Time- PCR برای تشخیص *P. betae* با قابلیت شناسایی رونوشت های¹ اختصاصی قارچ در گیاهان آلوده بعنوان یک روش کاملاً اختصاصی و حساس در مطالعات کمی مناسب میباشد (Kingnorth *et al.*, 2003a; Ward *et al.*, 2004)، اما استفاده از این روش مستلزم تجهیزات گران قیمت و پیشرفته می- باشد.

تواند بعنوان یک کاندیدای مناسب جهت شناسایی *P. betae* استفاده گردد (Mutasa *et al.*, 2000). لذا، ردیابی سرولوژیکی با استفاده از آنتی بادی اختصاصی این پروتئین و همچنین آزمون الایزای کمی برای شناسایی بوته های حساس و مقاوم به *P. betae* در چغندر قند برای اولین بار توسط Asher *et al.* (2008) انجام شد. در این بررسی نیز برای اولین بار در ایران سیستم الایزای کمی با استفاده از آنتی سرم اختصاصی *P. betae* در برابر پروتئین گلوکاتایون- اس - ترانسفراز جهت شناسایی *P. betae* در ریشه های آلوده چغندر قند بهینه سازی شد. به نظر می رسد می توان از این روش در غربال مقاومت ژرم پلاسم چغندر قند به *P. betae* بهره برد.

بنابراین استفاده از روش های مولکولی و مبتنی بر PCR به عنوان روشی سریع و دقیق و قابل اعتماد جهت تایید حضور و یا عدم حضور ناقل در گیاهان آلوده و همچنین ریشه علف های هرز و میزبان های ثانویه *P. betae* توصیه می شود. Muhanna *et al.* (2008) جهت ردیابی *P. betae* در ریشه علف های هرز تک لپه و دو لپه از RT-PCR استفاده کردند نتایج آن ها وجود *P. betae* را در برخی از علف های هرز تک لپه و دو لپه مزارع چغندر قند تایید کرد. در مطالعه پراکنش و اپیدمیولوژی بیماری ریزومانیا نیاز به بررسی ریشه علف های هرز مزارع چغندر قند می باشد. ردیابی میکروسکوپی به دلیل حذف قسمت های نکروتیک

¹ - Transcripts

- Asher MJC, Grimmert MK, Mutasa- Goettgens ES (2008). Selection and characterization of resistance to *Polymyxa betae*, vector of Beet Necrotic Yellow Vein Virus, derived from wild sea beet. *Plant pathology* 58: 250-260.
- Barr KJ, Asher MJC, Lewis BG (1995). Resistance to *Polymyxa betae* in wild Beta species. *Plant Pathology* 44: 301-307.
- Braselton, J P (1995). Current status of the plasmodiophorids. *Current Reviews in Microbiology* 21: 263-275.
- Darabi S, Masoomi M, Izadpanah K (2003). Rhizomania of sugar beet. Publication of Plant Virology Research Center of Shiraz Agriculture University (In Farsi).
- Delfosse P, Reddy AS, Legrève A, Thirumala Devi K, Abdurahman M D, Maraite H, Reddy DVR (2000). Serological Methods for Detection of *Polymyxa graminis*, an Obligate Root Parasite and Vector of Plant Viruses. *The American Phytopathological Society* 90: 537-545.
- Dick MW (2001). *Straminipilous Fungi: Systemics of the Pyrenomycetes including accounts of the marine Straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Draycott, AP (2006). *Sugar Beet (World Agriculture Series)*. Wiley-Blackwell. London. 496pp.
- Henry C (1996). Rhizomania- its effect on sugar beet yield in the UK. *Breeding sugar beet review* 64: 24-26.
- Izadpanah K, Hashemi P, Kamran R, Pakniat M, Sahandpour A, Masoomi M (1996). Wide existence of rhizomania sugar beet in Fars. *Plant Pathology* 32: 200-206 (In Farsi).
- Jalali S, Afzali H, Ravanloo A, Karimipourfard H, Baykzadeh N, Almasi H (2009). Distribution of fungus *Polymyxa betae* vector of root madness virus of sugar beet in Esfahan, Azarbayjan Gharbi and Razavi Khorasan provinces, *Journal of Research in Agriculture Science* 5(1): 69- 79 (In Farsi).
- Kingsnorth CS, Kingsnorth AJ, Lyons PA, Chwarszczynska DM, Asher MJC (2003a). Real-time analysis of *Polymyxa betae* GST expression in infected sugar beet. *Molecular Plant Pathology* 4:171-176.
- Kingsnorth CS, Asher MJC, Keane GJP, Chwarszczynska DM, Luterbacher MC, Mutasa-Göttgens ES (2003b). Development of a recombinant antibody ELISA test for the detection of *Polymyxa betae* and its use in resistance screening. *Plant Pathology* 52:673-680.
- Lamey HA (1992) .The rhizomania disease of sugar beet, *Sugar Beet Research and Extension Reports USDA*. 23: 149-152.
- Legrève A, Delfosse P, Van HV, Bragard C, Maraite H (2003). Broad- spectrum detection of *Polymyxa* species and form species by polymerase chain reaction. In *Proceedings of the 5th symposium of the internal working group on plant viruses with fungal vectors* ; Eds. C. M. Rush & U. Merz; Zurich, Switzerland.
- Lennefors BL (2006) *Molecular breeding for resistance to rhizomania in sugar beets*. Ph. D. thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 44pp.
- Liu HY, Lewellen RT (2007). Distribution and molecular characterization of resistance-breaking isolates of Beet necrotic yellow vein virus in the United States. *Plant Disease* 91: 847-851

- McGrann GRD, Grimmer MK, Mutasa- Gottgens EF, Steven M (2009). Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology* 10: 129- 141.
- Mesbah M, Scolten OE, DeBock TSM, Lange W (1997). Chromosome localization of genes for resistance to *Heterodera schachtii*, *Cercospora beticola*, and *Polymyxa betae* using sets of *Beta procumbens* and *B. pattellaris* derived monosomic additions in *B. vulgaris*. *Euphytica*, 97: 117- 127.
- Meunier A, Schmit J F, Stas A, Kutluk N, Bragard C (2003). Multiple reverse transcription –PCR for simultaneous detection of beet necrotic yellow vein virus, Beet soil born virus , and Beet virus Q and their vector *Polymyxa betae* on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2356- 2360.
- Mouhanna AM, Langen G, Schlosser E (2008). Weeds as alternative hosts for BSBV, BNYVV, and the vector *Polymyxa betae* (German Isolate). *Journal of Plant Disease and Protection* 115: 193- 198
- Mutasa-Göttgens EF, Chwarszczynska D, Adams M, Ward E, Asher MJC (1995). Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots and its application in field studies. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 303-313
- Mutasa-Göttgens EF, Chwarszczynska D, Halsey K, Asher MJC (2000). Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite *Polymyxa* – a targeted recombinant DNA approach. *Plant Pathology* 49: 276-287.
- Paul H, Henken B, De Bock TSM, Lange W (1992). Resistance to *Polymyxa betae* in *Beta* species of the section procumbentes, in hybrids with *Beta vulgaris* and in monosomic chromosome additions of *Beta procumbens* in *Beta vulgaris* *Plant Breeding* 109: 265–273.
- Paul H, Henken B, Scolten OE, De Bock TSM, Lange W (1993). Variation in the level of infection with *Polymyxa betae* and its effect on infection with Beet Necrotic Yellow Vein Virus in beet accession of the sections *Beta* and *Corollinae*. *Proceedings of the 2nd Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*. Montreal, Canada, pp. 133-136.
- Pavli OL, Stevanato P, Biancardi E, Skaracis GN (2011). Achievements and prospects in breeding for rhizomania resistance in sugar beet. *Field Crops Research* 122: 165- 172.
- Rush CM (2003). Ecology and epidemiology of *Benyvirus* and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* 41: 567–592
- Rush CM, Lewellen RT, Acosta- leal R (2006). The continuing saga of rhizomania of sugar beet in the United States. *Plant Disease* 90: 4- 15
- Safarpour H, Safarnejad MR, Tabatabaie M, Mohsenifar A, Rad F, Shahryari F, Hasanzadeh F (2012). Development of a quantum dots FRET-Based biosensor for efficient detection of *Polymyxa betae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. In Press.
- Verchot- Lubicz J, Rush CM, Payton M, Colberg T (2007). Beet necrotic yellow vein virus accumulates inside resting spores and zoosporangia of its vector *Polymyxa betae* BNYVV infects *P. betae*. *Virology Journal*. 4:37.
- Ward LI, Fenn MGE, Henry CM (2004). A rapid method for detection of *Polymyxa* DNA in soil. *Plant Pathology* 53: 485-490.

Detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots using microscopical, serological and molecular methods

Hassanzadeh F.*¹, Rezaee S.¹, Mahmoudi S.B.², Norouzi P.², Safarnejad M.R.³, Safarpour H.^{4,5}

1- Ph.D. Student, Department of plant pathology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Sugar beet Seed Institute, Karaj, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Plant Viruses, Iranian Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

4- Department of Microbial Biotechnology and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

5- Ph. D Student in Pharmaceutical sciences, Faculty of Pharmacy, Shahid Beheshti Medical University.

Abstract

In order to design a precise diagnostic and quantitative system to detect of *P. betae* in sugar beet roots, three procedures including microscopical, serological and molecular methods were compared on a sugar beet cultivar susceptible to causal agent and vector of rhizomania disease. At first, susceptible cultivar Regina was cultivated in infested soil in greenhouse condition. After 5 weeks, roots of plants were stained with fuchsin- acid- lactophenol solution. Quantitative ELISA test was optimized with specific antiserum against recombinant protein glutathione s-transferase (GST) of *P. betae*. Running ELISA test, extracts of health and infected plants were prepared and used in DAS- ELISA test. Presence of *P. betae* in roots of plants was detected with amplification of rDNA of Plasmodiophoromycetes and *P. betae* species, simultaneously. Existence of cystosori of *P. betae* was observed in all of the plants planting in infested soil. Results of ELISA test were distinguished healthy plants from infected plants. Average of optical density at 405 nanometer for healthy plants, infected plants, protein PBS (negative control) and GST (positive control) was 0.126, 0.75, 0.11 and 2.45 respectively. Duplex PCR method was amplified two fragments of 454bp and 170bp in infected samples relating to rDNA region and specific region of the *P. betae*, respectively. Based on the results, it seems that, rapid detection and identification of *P. betae* in sugar beet and other hosts of the vector could be done on the basis of PCR method. Evaluating of resistance germplasm of sugar beet to *P. betae* could be recognized using quantitative ELISA tests.

Key words: *Rhizomania*, *Glutathione- S- transferase*, *ELISA*, *PCR*, *ITS*

* Corresponding Author: Hassanzadeh F.

Tel: 09132907622

Email: f.hasanzadeh@srbiau.ac.ir