مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1391)

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

فاطمه حسن زاده*[1]، سعید رضائی[1]، سید باقر محمودی[2]، پیمان نوروزی[2]، محمدرضا صفرنژاد[3]، 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 چغندرقند سه روش میکروسکوپی، سرولوژیکی و مولکولی روی یک رقم حساس به عامل و ناقل بیماری ریزومانیای چغندرقند 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 گلوتاتیون- 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 سیستوسورهای *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 چغندرقند و سایر میزبان های آن می توان از روش مبتنی بر PCR و برای ارزیابی مقاومت ژرم پلاسم چغندرقند از آزمون الایزا بهره برد.

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

* نویسنده مسئول: فاطمه حسن زاده تلفن: 09132907622 Email: f.hasanzadeh@srbiau.ac.ir

مقدمه

پلاسمودیوفورید *Polymyxa betae* انگل اجباری خاکزی از رده پلاسمودیوفورومیست ها[1] است که بیشتر به گیاهان خانواده اسفناجیان محدود می‌شود. این ناقل ویروس‌های زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند[2]، ویروس خاکزاد چغندرقند[3]، ویروس موزائیک خاکزاد چغندرقند[4] و ویروس Q چغندرقند[5] می‌باشد (Drycott, 2006). ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندرقند عامل بیماری ریشه گنایی (ریزومانیا) در چغندرقند است (Rush *et al*., 2003). در حال حاضر ریزومانیا مهمترین بیماری چغندرقند محسوب می‌شود (Lennofers *et al*., 2006) و سالانه خسارت شدیدی به این محصول صنعتی وارد می‌سازد. 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 می‌شوند (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 مقاوم، بهترین راه مبارزه با بیماری ریزومانیا محسوب می شود (Rush *et al*., 2006). اغلب ارقام مقاوم به ریزومانیا، که در سراسر جهان کشت می‌شوند 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 ژنوتیپ‌های 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 گونه‌های وحشی مانند *Beta patellaris* مشاهده شده است. در این گونه، *P. betae* پس از ایجاد آلودگی اولیه، قادر به تکمیل چرخه زندگی خود نمی‌باشد (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 پلاسم 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 می‌باشند را شناسایی نمود.

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

[1] - Plasmodiophoromycetes
[2]-*Beet necrotic yellow vein virus*
[3]- *Beet soil born virus*
[4]- *Beet soil born mosaic virus*
[5]- *Beet virus Q*

اسپورهای استراحتی در ریشه های فرعی بوته های چغندرقند 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 گروه ها مقاومت به *P. betae* با کاهش در غلظت ویروس در ریشه چه های بوته ها در ارتباط بوده است. مطالعات ژنتیک مقاومت به *P. betae* در لاین های مونوسومیک چغندرقند بر اساس شمارش اسپورهای استراحتی در ریشه ها با استفاده از میکروسکوپ، نشان داد که ژن های مقاومت به *P. betae* روی کروموزوم های 4 و 8 در گروه *B. procumbentes* (Paul *et al*., 1992) و کروموزوم-های هومولوگ 4/1 و 8/1 در گروه *B. patellaris* قرار دارد (Mesbah *et al*., 1997). آنتی سرم پلی کلونال تهیه شده در برابر پروتئین گلوتاتیون- اس- ترانسفراز[1] *P. betae* (Kingnorth *et al*., 2003b) غربال رأس شمارهایی[2] از *B. vulgaris* ssp. *maritima* را توسط آزمون DAS- ELISA فراهم نمود. مقاومت به *P. betae* از *B. maritima* به لاین های چغندرقند از طریق تلاقی کلاسیک انجام و نتایج نشان داد که سطح آلودگی به ویروس در لاین های چغندرقند کاهش یافته است. مطالعات بیشتر با استفاده از نشانگرهای مولکولی در جمعیت‌های در حال تفرق، دو مکان ژنی مقاومت به *P.betae* را به نام های pb1 و pb2 روی کروموزوم های شماره 4 و 9 در چغندرقند شناسایی کرد (Asher *et al*., 2008). ردیابی *P. betae* با استفاده از تکنیک های مولکولی و مبتنی بر اسید نوکلئیک در بوته های آلوده به صورت کیفی توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاه از نشانگر های 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 الایزا با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه پروتئین نوترکیب گلوتاتیون- اِس- ترانسفراز *P. betae*، جهت کمی نمودن میزان آلودگی به *P. betae* در ریشه گیاهان به منظور غربال بوته های مقاوم بهینه سازی شد. همچنین ردیابی سریع *P. betae* در ریشه های گیاهان آلوده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی منطقه rDNA پلاسمودیوفورومیست ها و آغازگر اختصاصی *P. betae* بررسی شد.

[1] - Glutathione-S-transferase
[2] - Accession

مواد و روش ها

ردیابی میکروسکوپی *P. betae* در ریشه چغندرقند

بدین منظور، ابتدا از خاک مزرعه آلوده به بیماری ریزومانیا از 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. سیستوسورهای قارچ توسط میکروسکوپ Nikon مدل E800 با بزرگنمایی 40X ردیابی شدند (Mesbah *et al*., 1997).

ردیابی سرولوژیکی *P. betae* در ریشه چغندرقند

در این روش با استفاده از آنتی بادی اختصاصی بر علیه پروتئین نوترکیب GST پلاسمودیوفورید *P. betae* جدایه زرقان فارس (تهیه شده توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج)، آزمون الایزا به روش ساندویچ دو طرفه (DAS- ELISA) مطابق روش صفرپور و همکاران (Safarpour *et al*., 2012) با تغییرات اندکی انجام شد. آنتی‌بادی غیر نشان‌دار به هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا در رقت‌های 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 ریشه‌های آلوده و سالم چغندرقند با استفاده از بافر عصاره‌گیری (شامل توئین20، 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 شست‌وشوی پلیت با PBS-T، آنتی‌بادی چند همسانه‌ای نشان‌دار در رقت 1 به 1000 اضافه شد و پلیت برای مدت سه ساعت در 37 °C قرار گرفت. پس از شست‌وشو، سوبسترای پارانیترو فنیل فسفات به چاهک ها اضافه و واکنش رنگی بعد از یک ساعت در طول موج 405 نانومتر توسط دستگاه قرائت‌گر الایزا اندازه گیری شد.

ردیابی مولکولی *P. betae* در ریشه چغندرقند

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 زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به دو ناحیه از DNA ی پروتیستای *P. betae* (جدول1) به دو صورت جداگانه و همزمان بهینه سازی شد. واکنش Duplex- PCR در حجم 20 میکرولیتر شامل 2

میکرولیتر بافر PCR (10X)، 2 میکرولیتر ($MgCl_2$25mM)، 1/6 میکرولیتر dNTPs (10mM)، 1 میکرولیتر از هر چهار آغازگر (30ng)، 0/2 میکرولیتر از آنزیم Taq DNA Polymerase، 1 میکرولیتر DNA الگو و 9/2 میکرولیتر آب مقطر انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل 5 دقیقه در°C 95 و 37 چرخه، ° 95 به مدت 40 ثانیه، °C 55 برای 1 دقیقه، °C 72 به مدت 1 دقیقه و مرحله گسترش نهایی در°C 72 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 چغندرقند بعد از پنج هفته که در خاک آلوده بودند اسپورهای مقاوم *P. betae* مشاهده شد (شکل1). اسپورهای 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 اسپورهای 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 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 چغندرقند 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.

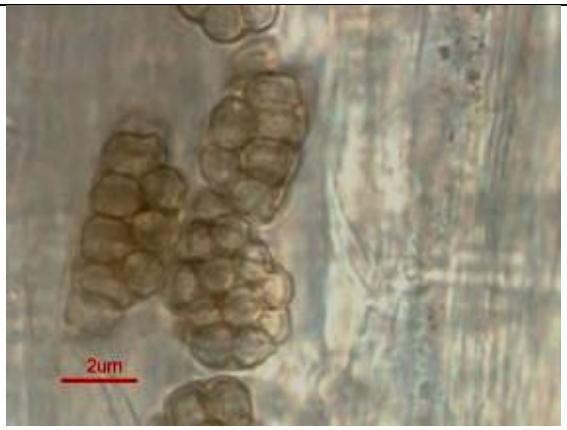
تکثیر همزمان منطقه rDNA و منطقه اختصاصی *P. betae* توسط PCR

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 bp 454 بود و باند نشانگر اختصاصی *P. betae* شامل bp 170 بود (شکل 3).

جدول1- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Duplex- PCR.

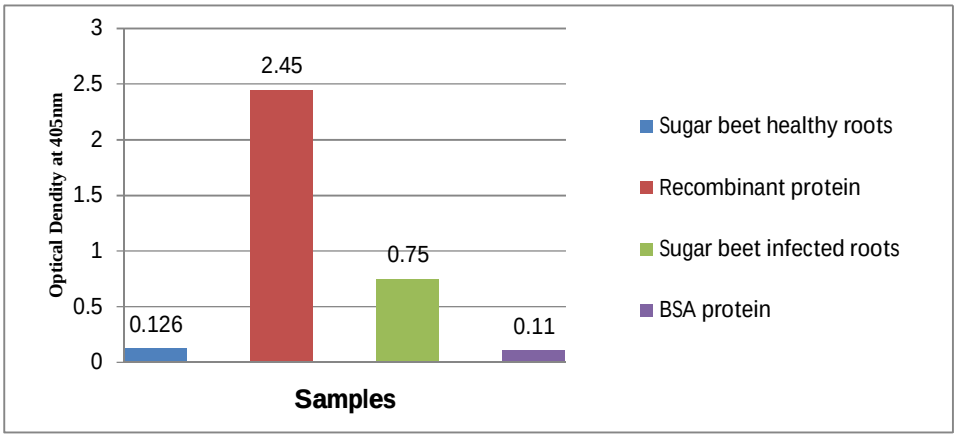
Table 1- The sequences of primers used in Duplex PCR.

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)
P. betae repetitive *Eco*RI like fragment	PB4: 5'- CAAAGGCCTGAAATCATCTAAC-3' PB4rev: 5'- GATGGCCCAATTCCTTACAC-3'	170	Meunier, A(2003)



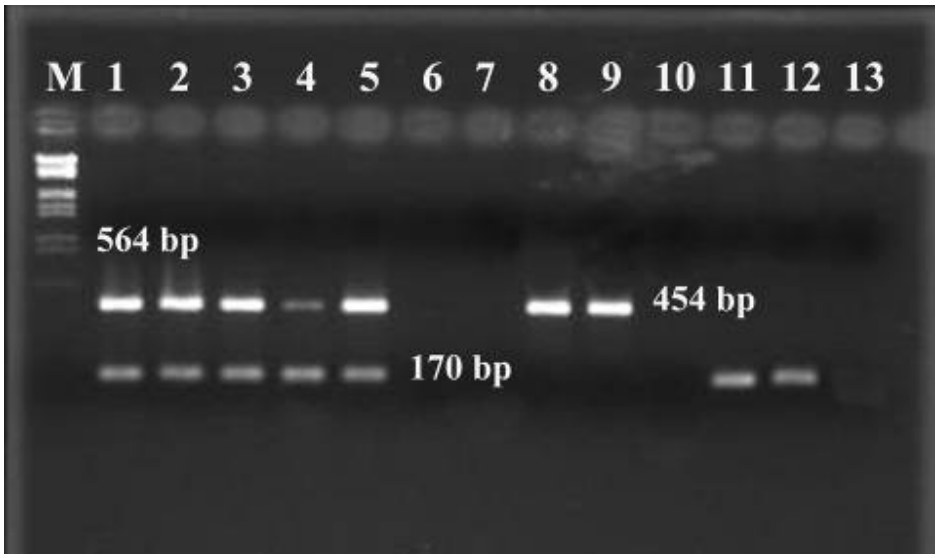
شکل 1- اسپورهای مقاوم *P. betae* به صورت تجمعی (Cystosori).

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 نمونه ها 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.



شکل3- الگوی باند اختصاصی 454 bp منطقه ریبوزومی 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 ریبوزومی، ردیف10 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.

بحث

بیماری ریزومانیا مهمترین بیماری چغندر قند در ایران (Darabi *et al*., 2003) و دنیا (Pavli *et al*., 2011) می‌باشد. محدودیت دسترسی به منابع ژنتیکی برای ایجاد مقاومت علیه ویروس عامل این بیماری از جمله مهمترین چالش‌ها در مقابله با این بیماری است (Lie *et al*., 2007). با توجه به اینکه انتقال طبیعی این بیماری منحصراً با پلاسمودیوفورید *P. betae* صورت می‌پذیرد (Vector-lubicz *et al*., 2007)، جلوگیری از ورود ناقل به گیاه می‌تواند 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 پلاسم مقاوم نیاز به روش های ردیابی دقیق و سریع آن می باشد. تا به حال روش‌های مختلفی از

قبیل هیبریداسیون DNA (Mutasa *et al*., 1993)، PCR کمی[1] (Ward *et al*., 2004) و روش‌های سرولوژیکی[2] (Kingsnorth *et al*., 2003b) برای تشخیص، بررسی کمی میزان آلودگی و ارزیابی مقاومت به پروتیستای *P. betae* استفاده شده است. روش های مبتنی بر هیبریداسیون DNA، قابلیت شناسایی *P. betae* در گیاه را دارا می باشند (Mutasa *et al*., 1993)، اما این روش ها به تنهایی قادر به تعیین میزان کمی آن در گیاه نیستند. به علاوه، این روش ها نمی توانند 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 ریشه های گیاهان مقاوم و حساس هستند (Barr *et al*., 1995). روش های سرولوژیکی امروزه به صورت متداول برای شناسایی عوامل بیماریزای گیاهی و بررسی میزان زاد مایه عوامل بیماریزا مورد استفاده قرار می گیرند. این روش‌ها قابلیت ارزیابی کمی و کیفی پروتئین ها 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 بیمارگر در ریشه گیاهان مورد بررسی قرار گیرد. بررسی میکروسکوپی، مورفولوژی اسپورهای 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 دسته های اسپورهای استراحتی مشاهده شده *P. betae* به اشکال مختلف نامنظم (irregular clusters) و چند لایه‌ای (Multiple) در ریشه چه های چغندرقند مشاهده شد. هر چند اسپورهای استراحتی جنس های پلاسمودیوفورومیست خصوصیات مشخصی ندارند اما ترتیب و آرایش آن‌ها در تفکیک جنس ها مفید است (Braselton, 1995). در دیگر جنس های این خانواده اسپورهای استراحتی به صورت گوی های تهی، توده های اسفنجی و یا منفرد دیده می شود (Dick, 2001). استفاده از میکروسکوپ نوری جهت شناسایی پلاسمودیوفورید *P. betae* هر چند روشی ساده برای مشاهده فرم پایدار ناقل است اما به دلیل پاره ای از محدودیت ها از جمله ندیدن فرم های نابالغ و کوچک شبه قارچ و عدم تمایز بین زئوسپورانژیوم ها و اسپورهای مقاوم با سایر قارچ-ها غیر قابل اطمینان و زمان‌بر است.

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

[1] - Quantitative PCR

[2] - Serological method

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 چغندرقند 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 گلوتاتیون- اس- ترانسفراز جهت شناسایی *P.betae* در ریشه های آلوده چغندرقند بهینه سازی شد. به نظر می رسد می توان از این روش در غربال مقاومت ژرم پلاسم چغندرقند 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 چغندرقند تایید کرد. در مطالعه پراکنش و اپیدمیولوژی بیماری ریزومانیا نیاز به بررسی ریشه علف های هرز مزارع چغندرقند می باشد. ردیابی میکروسکوپی به دلیل حذف قسمت های نکروتیک 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 مراز 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 نمونه‌های 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 رونوشت‌های[1] 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.

[1] - Transcripts

منابع

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.

Legreve 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 rhizomonia 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. pattelaris* 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