

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

بهروز جعفرپور\* - محمدعلی سبک‌خیز - فاطمه طبسی نژاد<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۴

### چکیده

ویروس خاکزاد چغندرقند<sup>۲</sup> (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 دمیرگها 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

گردید (۷، ۲، ۶). لسمن<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۱۹۸۹ دوسروتیپ این ویروس به نامهای آهلوم<sup>۵</sup> و ویرث<sup>۶</sup> را توصیف نمودند (۶). بررسیهای اخیر مشخص کرد که سروتیپ ویرث، یک گونه ویروسی مجزا به نام ویروس Q چغندرقند<sup>۷</sup> می‌باشد (۶). این دو ویروس به همراه دو ویروس بوته‌جارویی سیب‌زمینی<sup>۸</sup> (PMTV) و ویروس بافت‌مردگی

ویروس خاکزاد چغندرقند (BSBV) اولین بار از ریشه‌های چغندرقند (*Beta vulgaris*) در نورفولک<sup>۳</sup> انگلستان در سال ۱۹۸۲ گزارش شد و از آن زمان به بعد از هلند، بلژیک، آمریکا، سوئد، آلمان، فرانسه و ایران گزارش

۱- به ترتیب استاد، کارشناس آموزشی و دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی

گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

Email:bjafarpour@ferdowsi.um.ac.ir

\*- نویسنده مسئول:

2- Beet soilborne virus

3- Norfolk

4- Lesmann

5- Ahlum

6- Wierthe

7- Beet virus Q

8- Potato mop top virus

(*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 ۱۹ kDa 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 اسیدآمین 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 فوروویروسها فاقد دنباله پلی‌آدنین (Poly-A tail) می‌باشد (۶).

در ایران ویروس خاکزاد چغندرقد (BSBV) برای اولین بار در سال ۱۳۷۹ از مزارع چغندرقد 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 چغندرقد به دو ویروس BSBV و BNYVV مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

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

باقلا<sup>۱</sup> (BBNV) در جنس *Pomovirus* قرار می‌گیرند. ناقل ویروسهای خاکزاد چغندرقد، Q چغندرقد و رگبرگ‌زدنکروتیک چغندرقد<sup>۲</sup> (BNYVV) قارچ *Polymyxa betae* Keskin می‌باشد که یک پارازیت اجباری ریشه‌های چغندرقد، می‌باشد (۶).

ویروس خاکزاد چغندرقد 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 چغندرقد وجود دارند (۱ و ۵). این ویروس ایجاد علائمی 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 چغندرقد گزارش داده‌اند. دامنه میزبانی این ویروس محدود به خانواده سلمه (*Chenopodiaceae*) می‌باشد.

BSBV یکی از ویروسهایی است که هرگز با درجه خلوص بالا به دست نیامده است زیرا پیکره‌های آن قابلیت شکنندگی و تمایل به چسبندگی<sup>۳</sup> بالایی دارند. RNA1 این ویروس متشکل از ۵۸۳۴ نوکلئوتید است و دارای یک ORF بزرگ جهت کد کردن یک پروتئین پیوسته خوانی<sup>۴</sup> 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 به ترتیب شامل آنزیمهای متیل ترانسفراز<sup>۵</sup>، هلیکاز و RNA پلی‌مراز می‌باشد و برخلاف فوروویروسها (*Furovirus*) و تویراویروسها

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

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 (پی‌نیتروفیل فسفات) 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 و پس 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 نسبت‌های مختلف آلوده به این ویروس بودند و در مزارع

اسفراین بازدید به عمل 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. به منظور شناسایی و تشخیص ویروس خاکزاد چغندر قند از روش سرولوژیکی TAS-ELISA<sup>۱</sup> استفاده شد. همچنین تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت بررسی آلودگی همزمان چغندر قند به ویروسهای خاکزاد چغندر قند (BSBV) و رگبرگ زردنکروتیک چغندر قند (BNYVV) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت شناسایی ویروس رگبرگ زردنکروتیک چغندر قند (BNYVV) از روش سرولوژیکی DAS-ELISA<sup>۲</sup> استفاده گردید.

**آزمون تاس - الیزا (TAS-ELISA) جهت شناسایی ویروس خاکزاد چغندر قند:** در این روش از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای به عنوان آنتی‌بادی به دام اندازنده و از آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای به عنوان شناسنده استفاده شد.<sup>۳</sup> 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 بلو کینگ (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 بلو کینگ 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+2% egg albumin+%2 PVP) به نسبت ۱/۱۰۰۰ رقیق شده بود به هر چاهک اضافه و به مدت ۴-۲ ساعت در

1- Triple Antibody Sandwich ELISA  
2- Double Antibody Sandwich ELISA

۳- معرفی این آزمون از شرکت DSMZ آلمان خریداری شدند.

شهرستان اسفراین، آلودگی مشاهده نشد. این اولین گزارش از وجود ویروس خاکزاد چغندر قند در شهرستانهای شیروان و بجنورد واقع در استان خراسان شمالی می باشد.

**بررسی آلودگی همزمان به ویروسهای BSBV و BNYVV:** پس از انجام آزمونهای تاس- الیزا (TAS-ELISA) و داس- الیزا (DAS-ELISA) بر روی تمام نمونه های جمع آوری شده از مزارع مختلف استان خراسان شمالی، مشخص گردید که از مجموع ۹۰ نمونه جمع آوری 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 نمونه ها در مقایسه با علایم بوته های آلوده به هر ویروس، نسبتاً شدیدتر بود. همچنین مشخص گردید که علایم آلودگی به BSBV و BNYVV در مزرعه قابل تفکیک و تمایز نمی باشد و برای تشخیص دقیق هر یک نیاز به بهره گیری از روشهای سرولوژیکی و آزمایشگاهی است.

جدول ۱: نتایج بررسی آلودگی مزارع چغندر قند 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 چغندر کاریهای کشور وارد نموده است تصور می شود که شناسایی و بررسی خسارت ویروس خاکزاد چغندر قند مورد توجه قرار نگرفته است. نظر به اینکه ناقل هر دو ویروس ذکر شده قارچ *Polymyxa betae* می باشد و با توجه به منابع گزارش شده در ارتباط با شناسایی BSBV در سطح استان و کشور احتمال می رود که ویروس خاکزاد چغندر قند (BSBV) نیز همانند BNYVV در سایر نقاط استان و احتمالاً سطح کشور به طور گسترده وجود داشته باشد که لازم است بررسیهای بیشتری در این زمینه به عمل 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 چغندر قند می شود لذا بررسی دقیق قارچ ناقل و ارایه راه کارهای کاهش جمعیت آن امری بسیار ضروری می باشد.

جهت پیشگیری از آلودگی و از انتشار هر چه 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 می گردد.

منابع

- ۱- جعفرپور، ب.، ب. جعفرپور و م. فلاحتی رستگار. ۱۳۸۲. بررسی ویروسهای رگبرگ زرد نکروتیک چغندر (BNYVV) و خاکزاد چغندر (BSBV) در شمال استان خراسان. مجله علوم و صنایع کشاورزی. جلد ۱۷ شماره ۱.
- ۲- جعفرپور، ب. و ب. جعفرپور. ۱۳۷۹. آلودگی مزارع چغندر قند استان خراسان به ویروس خاکزاد چغندر قند. 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 cause 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<sup>1</sup>

### 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](mailto:bjafarpour@ferdowsi.um.ac.ir)

1- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad