وقوع تیپ B ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند (BNYVV) عامل بیماری رایزومانیادر استانهای خراسان رضوی و شمالی

بهروز جعفرپور*- محمدعلی سبک‌خیز -سارا قارونی کاردانی[1]

تاریخ دریافت:۸۵/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۶/۵/۷

چکیده

بیماری رایزومانیا یکی از بیماری‌های مهم و مخرب چغندرقند در سراسر دنیا می‌باشد که در سالهای اخیر خسارات هنگفتی را به محصول چغندرقند در کشور ما وارد کرده است. این ویروس به‌وسیله قارچ خاکزاد*Polymyxa betae* منتقل می‌شود و دارای سه تیپ A،Bو P می‌باشد. تیپB از لحاظ گسترش جهانی در مقام دوم پس از تیپ A قرار دارد. در این بررسی جهت شناسایی تیپ B از روش RT-PCR استفاده گردید. ابتدا نمونه‌های مشکوک به بیماری از مزارع مختلف استانهای خراسان رضوی و شمالی جمع‌آوری شد و آلودگی آنها با آزمون DAS-ELISA مشخص گردید. آزمون RT-PCR برای تشخیص تیپ B با ایجاد تغییراتی شبیه روش بکار رفته در تیپ A بود.در این روش، پس از استخراج RNAی کل گیاه با استفاده از روش رسوب با PEG_{6000}، cDNAی ویروس با استفاده از آغازگر اختصاصی معکوس (مربوط به ناحیه TGB از RNA2 ژنوم ویروس)، ساخته شد و به دنبال آن با استفاده از cDNAی تکثیر شده و آغازگرهای اختصاصی واکنش PCR صورت گرفت. الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد و پلی اکریل آمید ۵ درصد نشان داد که در سه نمونه از ۲۰ نمونه مورد آزمایش، قطعه تکثیر شده مربوط به تیپ B در محدوده ۱۷۸ bp وجود دارد. این اولین گزارش از وجود تیپ B با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در آزمون RT-PCR می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : BNYVV، تیپ B، RT-PCR و پرایمرهای اختصاصی

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) به‌طور وسیعی در استانهای خراسان رضوی و شمالی کشت می‌شود. بیماری ویروسی خاکزاد رایزومانیا مهمترین بیماری ویروسی چغندرقند در این استانها بوده و هر ساله خسارات فراوانی را به محصول چغندرقند وارد می‌کند تا حدی که برخی از مزارع چغندرقند را از کشت این محصول استراتژیک محروم کرده است. بیماری رایزومانیا اولین بار توسط کانوا[2] از ایتالیا گزارش شد و تا کنون از بسیاری از کشورهای دنیا از جمله بلژیک، بلغارستان، فرانسه، آلمان، یونان، مجارستان، قزاقستان، قرقیزستان، هلند، لهستان، رومانی، سوئد، سوئیس، ترکیه، اکراین، انگلستان، یوگسلاوی، چین، ژاپن، سوریه و

۱. به ترتیب استاد ،کارشناس آموزشی و دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

* نویسنده مسئول Email:Bjafarpour @ Ferdowsi.um.ac.ir

2. Canova

Archive of SID

www.SID.ir

آمریکا گزارش شده است (۱۰). در ایران برای اولین بار وجود گسترده بیماری رایزومانیا در فارس توسط ایزدپناه گزارش گردید (۱) و سپس آلودگی مزارع استانهای خراسان رضوی و شمالی توسط جعفرپور و همکاران گزارش شد (۲ و ۳)، طبق بررسی ایشان خسارتی که این بیماری به محصول چغندرقند در این استانها وارد می‌کند تا مرز ۷۰ درصد نیز می‌رسد. در ایران تحقیقات فراوانی در این زمینه انجام شده است که از جمله اینها می‌توان به گزارش دوتیپ A و Bتوسط جواد طالبی و همکاران در سالهای اخیر اشاره کرد (۴).

ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند[1] (BNYVV)، عامل بیماری رایزومانیا متعلق به جنس *Benyvirus* است که توسط یک قارچ خاکزاد به نام *Polymyxa betae* Keskin (خانواده Plasmodiophoraceae) انتقال می‌یابد. BNYVV قادر است به مدت بیش از ۱۵ سال در سیستوسورهای *P. betae* باقی بماند (۱۰).

ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند دارای ذرات میله‌ای شکل به قطر ۲۰ و با چهار طول مختلف ۸۵، ۱۰۰، ۲۶۵ و ۳۹۰ نانومتر می‌باشد. هر کدام از این ذرات به ترتیب حاوی چهار قطعه RNAی تک رشته‌ای مثبت به اندازه‌های ۱۴۶۷، ۱۷۷۴، ۴۶۱۲ و ۶۷۴۶ جفت باز می‌باشند. دو نژاد اصلی این ویروس یعنی تیپهای A و B دارای این چهار قطعه RNA می‌باشند. وجود RNAی پنجمی نیز در ارتباط با این چهار قطعه در برخی تیپهای این ویروس در کشورهای ژاپن، چین، انگلستان، فرانسه و قزاقستان گزارش شده است که به آن تیپ P اطلاق شده است. جدایه‌های حاوی RNAی پنجم ایجاد علائم شدیدتر و در نتیجه خسارت بیشتری به محصول چغندرقند وارد می‌کنند (۶).

شیوع گسترده بیماری رایزومانیا در استانهای خراسان رضوی و شمالی و حساسیت بسیاری از ارقام چغندرقند در منطقه، ما را بر آن داشت تا اقدام به شناسایی دقیق تیپهای ویروس عامل بیماری با روش RT-PCR نماییم. هنری و همکاران (۱۹۹۵ و ۱۹۹۶) از این روش در شناسایی و ردیابی BNYVV استفاده نمودند (۷ و ۸).

مواد و روش ها

به منظور شناسایی تیپ B ویروس عامل بیماری رایزومانیا در استانهای خراسان رضوی و شمالی در تابستان و اوایل پاییز ۱۳۸۴ از مزارع چغندرقند شهرستانهای چناران، قوچان، شیروان، بجنورد، مشهد، گلبهار، نیشابور، سبزوار، فریمان، تربت جام، تربت حیدریه بازدید به عمل آمد و تعداد ۵۲۰ نمونه مشکوک به آلودگی و دارای علائم بیماری جمع‌آوری گردید و پس از قطع برگ بوته‌ها، غده‌ها در پاکتهای کاغذی همراه با ثبت مشخصات قرار داده شد و در سردخانه دانشکده کشاورزی تا هنگام بررسیهای بعدی نگهداری گردید. جهت اثبات آلودگی نمونه‌ها به ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقند (BNYVV) ازروش داس الیزا (DAS-ELISA)[2] استفاده شد.

آزمون داس ـ الیزا

این آزمون بر اساس روش کلارک و آدامز با اندکی تغییرات انجام شد(۵). ارزیابی نتایج نمونه‌ها بر اساس تغییر رنگ آنها نسبت به شاهد منفی به طور چشمی یا با استفاده از دستگاه الیزاخوان (ELISA Reader, Avareness, Stat fax-2100) در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌هایی که بیشترین جذب را در دستگاه الیزاخوان نشان دادند در آزمون RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. جهت نگهداری این نمونه‌ها، قطعاتی از غده‌ها به همراه مقداری از ریشکهای آنها را در داخل ورقه

1. Beet necrotic yellow vein virus

2. Double antibady sandwich enzyme linked immunosorbent assay

Archive of SID

www.SID.ir

آلومینیومی قرار داده و سپس با استفاده از نیتروژن مایع منجمدکرده و بلافاصله همراه با ثبت مشخصات نمونه به فریزر ۲۰ °C- منتقل گردیدند.

استخراج RNAی کل گیاه

جهت استخراج RNAی کل گیاه از روش رسوب با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG_{6000}) استفاده شد و تمام بافرهای مورد استفاده با DEPC[1] تیمار گردید. بدین منظور چند قطعه از غده منجمد شده را درون هاون چینی تمیز و سرد قرار داده و با کمک ازت مایع کاملاً به صورت پودر در آمد. سپس ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر حاصل را به یک میکروتیوب ۱/۵ml منتقل نموده و ۴۰۰ میکرولیتر فنل اشباع و ۴۰۰ میکرولیتر بافر TNE (نسبت ۱ به ۲، وزنی: حجمی) (100mM Tris/HCL, pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 2%SDS and 2% 2-Mercaptoethanol) اضافه شد. مخلوط حاصل به شدت تکان داده شد و بلافاصله با دور ۱۳۴۰۰rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. فاز رویی به میکروتیوب جدید انتقال داده شد وسپس ۱۰۰ میکرولیتر فنل و ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم (نسبت ۱ به ۱، وزنی:حجمی) به آن اضافه شد. بعد از سانتریفوژ با همان دور قبلی و زمان ۱ دقیقه، فاز رویی به میکروتیوب جدیدی منتقل شد و سپس دو حجم کلروفرم (۲۰۰ میکرولیتر) به میکروتیوب اضافه شد و پس از سانتریفوژ، فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید. حجم فاز رویی کاملاً مشخص شد و با استفاده از فرمول زیر، مواد زیر به آن اضافه شد:

۱۰۰ میکرولیتر فاز رویی + ۱۵/۰۹ میکرولیتر PEG_{6000} ۵۰ درصد + ۱۰/۶۹ میکرولیتر NaCl ۵ مولار

حجم نهایی = ۱۲۵/۷۸ میکرولیتر

(غلظت PEG_{6000} در این مرحله ۶ درصد و غلظت NaCl، ۵۰۰ میلی‌مولار است).

مخلوط حاصل به آرامی سروته شد تا کاملاً حل شود. سپس میکروتیوب حاوی مخلوط فوق به مدت ۱۰ دقیقه در روی یخ و در یخچال نگهداری شد. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۴۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. فاز رویی حذف و رسوب حاصل با ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید. فازرویی حذف و رسوب حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. رسوب در ۲۰ میکرولیتر بافر TE (pH ۸) حل گردید و تا استفاده‌های بعدی در فریزر (۲۰°C-) نگهداری شد. جهت اطمینان از صحت استخراج RNA، نمونه‌ها در روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، الکتروفورز شدند. RNAی ۲۰ نمونه از نمونه‌های آلوده به ویروس جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه برداری معکوس[2] (RT-PCR)

واکنش RT: جهت سنتز رشته‌ی DNAی مکمل (cDNA) از دستورالعمل شرکت Fermentase با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا در یک میکروتیوب، ۲ میکرولیتر از RNAی استخراج شده را با ۱۵pmolاز آغازگر معکوس اختصاصی ویروس[3] (حدود ۱/۵ میکرولیتر) مخلوط کرده و حجم آن با آب مقطر عاری از نوکلئاز به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در بن ماری نگهداری گردید و سپس به روی یخ منتقل شد. مواد زیر بعداً به مخلوط اضافه گردید و حجم نهایی واکنش با استفاده از آب مقطر تیمار شده با DEPC به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد.

۴ میکرولیتر 5x reaction buffer

1. Diethylpyrocarbonate

2. Reverse- Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

۳. توالی این پرایمر در قسمت واکنش PCR آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir

۲ میکرولیتر 10 mM 4dNTPmix

۰/۵ میکرولیتر Ribonuclease inhibitor

مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید و بدنبال آن ۲۰۰ واحد از آنزیم RT (M-MuLV Reverse Transcriptase) معادل یک میکرولیتر به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Tpersonal) با برنامه حرارتی ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد و در پایان جهت توقف واکنش، برنامه حرارتی ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و درجه نهایی ۴ درجه سانتیگراد جهت خنک کردن نمونه‌ها به دستگاه داده شد. cDNA حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری یا بلافاصله در واکنش PCR وارد گردید.

واکنش PCR: در این واکنش از پرایمرهای اختصاصی ویروس مربوط به ناحیه TGB[1] از RNAی دوم ویروس استفاده شد. توالی آغازگرهای اختصاصی که مورد استفاده قرار گرفتند برای آغازگر مستقیم Rhizo BF : 5'-TTG GGC AGC AAC TTA-3' و برای آغازگر معکوس Rhizo BR (Reverse): 5'-ACG GTG AGT ACA ACA TAC TGA-3' بود. آغازگر Rhizo BF مکمل موقعیت ۱۴۰۵ الی ۱۴۱۹ نوکلئوتیدی و آغازگر Rhizo BR همولوگ موقعیت نوکلئوتیدی ۱۵۶۲ الی ۱۵۸۲ از ژنوم RNA2 ویروس می‌باشند.این آغازگرها قطعه‌ای در حدود ۱۷۸bp را همانندسازی می کنند (۱۰).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و حاوی ۳ میکرولیتر از محصول cDNA، ۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq DNA* پلیمراز (شرکت سیناژن)، ۱۰pmol از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTP و ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x PCR و در برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه بعنوان واسرشته سازی آغازین و بدنبال آن، ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه بعنوان تکمیل پلیمریزاسیون در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Tpersonal) انجام گردید. محصول PCR در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد و یا بلافاصله در ژل آگارز ۱/۵ درصد تحت ولتاژ ثابت ۷۵ به مدت۲ ساعت در حضور نشانگر 100 bp DNA الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با دستگاه UV ترانسلومیناتور مشاهده می‌شد. همچنین با توجه به اینکه باند مورد انتظار بسیار کوچک بود (۱۷۸ bp) از ژل الکتروفورز عمودی پلی اکریل آمید نیز استفاده گردید. برای این منظور الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید ۵ درصد تحت ولتاژ ثابت ۱۲۰ به مدت دو ساعت انجام گردید. در پایان این مرحله رنگ آمیزی ژل با محلول نیترات نقره انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی اولیه ویروس با استفاده از آزمون داس الیزا

نتایج بدست آمده از آزمون الیزا نشان داد که اکثر مزارع مورد بررسی در استانهای خراسان رضوی و شمالی آلوده به ویروس می‌باشند و در مجموع از ۵۲۰ نمونه جمع‌آوری شده از شهرستانهای چناران، قوچان، شیروان، بجنورد، مشهد، گلبهار، اخلمد، نیشابور، سبزوار، فریمان، تربت جام، تربت حیدریه و رباط سفید، ۲۳۵ نمونه آلوده به (BNYVV) بودند. از بین ۲۳۵ نمونه آلوده، ۲۰ نمونه که چگالی نوری بیشتری را در دستگاه الیزاخوان نشان دادند جهت استخراج RNA کل گیاهی استفاده شد.

1. Triple gene block (رمز کننده سه پروتئینی که تصور می‌شود در حرکت ویروس نقش داشته باشد)

Archive of SID

www.SID.ir

آزمون RT-PCR

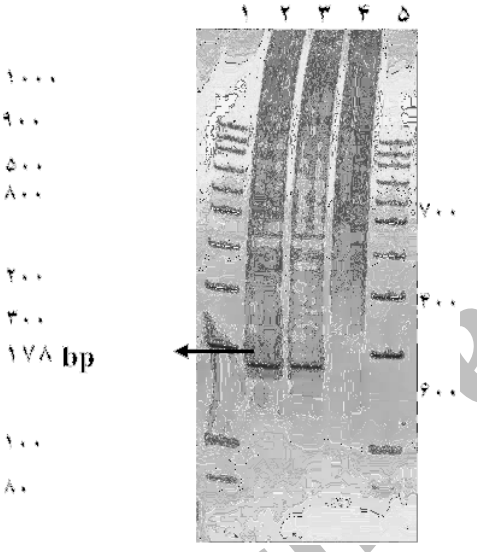
با توجه به هزینه‌های بالای این آزمون و عدم وجود مواد کافی، تنها ۲۰ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت. انجام آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تیپ B ویروس، منجر به تکثیر یک قطعه ۱۷۸bp شد که نتایج حاصل مطابق با اندازه مورد انتظار در منابع بود (۱۰). باند ۱۷۸bp در سه نمونه از ۲۰ نمونه مورد بررسی، وجود داشت که این نشان از وجود تیپ B ویروس عامل بیماریزا در منطقه دارد. سه نمونه مورد نظر متعلق به مزارع شیروان، چناران و جلگه رخ بود،شکل (۱ و ۲).

وقوع گسترده ویروس عامل بیماری رایزومانیا سالانه موجب خسارات هنگفتی در مزارع استانهای خراسان رضوی و شمالی می‌شود تا حدی که برخی از مزارع این دو استان را از کشت این محصول مهم و استراتژیک محروم کرده است. وجود این بیماری در تمام مزارع مورد بررسی با آزمون الایزا به اثبات رسید. در سالهای اخیر وجود روشهای حساس‌تری از قبیل استفاده از آنتی بادی منوکلنال و RT-PCR RFLP این امکان را به وجود آورده که تیپهای این ویروس نیز شناسایی شوند و با توجه به نتایج به دست آمده از سایر مناطق دنیا، تیپ A، تیپ غالب است و پس از آن تیپ B و سپس تیپ Pبیشترین فراوانی را دارند (۶ و ۱۰).

در سال اخیر پیشرفت زیادی در شناسایی این تیپها به‌عمل آمده است، به طوریکه با تعیین توالی نوکلئوتیدی، راتی و همکاران (۱۲) و هارجو[1] و همکاران (۶) اقدام به طراحی پرایمرهای اختصاصی این تیپها نمودند. وجود پرایمرهای اختصاصی تیپهای A و Bدر ناحیه TGB از RNAی شماره ۲ ویروس و پرایمر اختصاصی مربوط به RNAی شماره ۵ تیپ P، موجب کاهش هزینه‌های فراوانی در جهت شناسایی تیپهای این ویروس شده است.

1. Harju

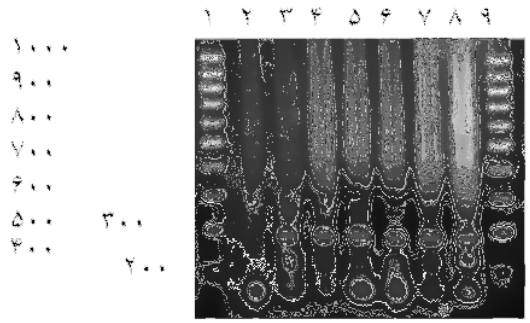
تکثیر باند ۱۷۸ bp در آزمون PCR با تغییرات قابل توجهی انجام شد و وجود این باند ابتدا در ژل آگارز ۱/۵ درصد به اثبات رسید ولی با توجه به کوچک بودن باند موردنظر و حساسیت بالای الکتروفورز عمودی ژل پلی اکریل آمید نیز ما را بر آن داشت تا از این آزمون برای اثبات نتایج خود با حساسیت بالاتر کمک بگیریم. رنگ‌آمیزی نهایی ژل پلی اکریل آمید وجود باند واضحی را در محدوده ۱۷۸ bp نیز نشان داد. این اولین گزارش از وجود تیپ B در منطقه مورد بررسی می‌باشد.



شکل (۱) الکتروفورز محصول RT-PCR ازدر ژل عمودی پلی اکریل آمید ۵ درصد رنگ آمیزی شده با نیترات نقره
ستون ۱ و ۵: نشانگر DNA (100 bp DNA ladder)
ستون ۲ و ۳: محصول PCR از نمونه‌های آلوده به ویروس و تکثیر باند در محدوده ۱۷۸ bp مربوط به تیپ B ویروس
ستون ۴: شاهد منفی (آب مقطر)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل (۲) الکتروفورز محصول RT-PCR در ژل افقی آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید
ستون ۱ و ۹: نشانگر DNA (100 bp DNA ladder) قطعات ۸۰ و ۱۰۰ به علت خروج از ژل مشاهده نمی‌شوند
ستون ۲: شاهد منفی (آب مقطر)
ستون ۳ تا ۸: محصول PCR از نمونه‌های آلوده به ویروس و تکثیر باند در محدوده ۱۷۸ bp مربوط به تیپ B ویروس

منابع

۱. ایزدپناه، ک. ۱۳۷۵. وجود گستره بیماری ریشه‌ریشی چغندرقند در فارس. بیماریهای گیاهی. جلد ۳۲. ص ۲۰۰ – ۲۰۶.

۲. جعفرپور، ب.، ب. جعفرپور و م. فلاحتی رستگار. ۱۳۷۹. شیوع بیماری رایزومانیا در استان خراسان. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۷۳.

۳. 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.

۴. جواد طالبی، علی. هاشمی، هاله. ملکی، مژده. ۱۳۸۳. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه تبریز. صفحه ۱۴۶.

5. Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of general Virology 34:475-483.
6. Harju, V. A., A., Skelton, G. R. G., Clover, C., Ratti, N., Boonham, and C. M., Henry. 2005. The use of real-time RT-PCR (TaqMan®) and post-ELISA virus release for the detection of beet necrotic yellow vein virus types containing RNA 5 and its comparison with conventional RT-PCR. Journal of Virological Methods, 123, 73-80.
7. Henry, C.M., Barker, I. and Hugo, S.A. 1996. Comparison of novel molecular methods for the detection of BNYYV. 1996 BCPC symposium proceeding. No. 65, 199-204.
8. Henry, C.M., Barker, I., Morris, J. and Hugo, S.A. 1995. Detection of beet necrotic yellow vein virus using reverse transcriptipn polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods, 54: 15-26.
9. Lemaire, O., M., Beuve, C.,Weber, A., Schirmer, D., Link, A., Meunier, C., Bragard and D. Gilmer. 2003. Etiology and molecular epidemiology of a severe rhizomania disase occurring in confined location in Europe: hypothesis for the implication of the RNA 3/ or 5 of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)-P pathotype. Proceeding of the 66th IIRB congress, 1-17.
10. Meunier, A., J. F. Schmit, A. Stas and C., Bragard. 2003. Sequence analysis of sugar beet viruses in Belgium and use of different PCR teqhniques for their detection and identification. Parasitica, 59 (1-2):19-23.
11. 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.
12. Ratti, C., G. R. G., Clover, C. R., Autonell, V. A., Harju, and Henry, C. M. 2005. A multiplex RT-PCR assay capable of distinguishing beet necrotic yellow vein virus types A and B. Journal of Virological Methods, 124, 41-47.

Archive of SID

www.SID.ir

Occurrence of the B type of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), the causal agent of rhizomania disease in Razavi and Northern Khorasan provinces

B.Jafarpour[*] – M.A. Sabokkhiz – S.Gharooni kardoni[1]

Abstraet

Rhizomania is one of the most economically important diseases of sugarbeet that causes a severe losses in root yield of sugarbeet in our country. Three types of BNYVV are known to exist, namely the A, B and P types. Distribution of type B in the world is in second rank after type A. As diagnosis of type B through serological methods or RT-PCR-RFLP are very costly, so we tried to use RT-PCR test in our research. Samples with rhizomania symptoms were collected from fields in Razavi and Nothern Khorasan provinces. Infection of samples was confirmed by DAS-ELISA. For RT-PCR experiments, at first we followed the previous protocol which has been set for the recognition of type A, but we could not get positive answer, so we changed RT-PCR protocol. After extraction of total RNA by PEG6000 percipitation method, cDNA of virus synthesized by using reverse specific primer (from TGB region of RNA2 of viral genome). PCR was performed with specific forward and reverse primers. PCR products were separated in 1.5% agarose gel and a 178bp band which was expected for type B appeared in 3 out of 20 samples which have been tested. This is the first report of the detection of type B of BNYVV through RT-PCR by using specific primers.

Key words: *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), type B, RT-PCR and specific primers.

Archive of SID

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

www.SID.ir