Archive of SID

ساخت سازه عفونت‌زای جدایه مشهد ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند (*Beet black scorch virus*) و بررسی واکنش برخی ارقام چغندرقند نسبت به آن در شرایط گلخانه

جمشید سلطانی ایدلیکی[۱]، محسن مهرور[۲*]، سیدباقر محمودی[۳]، محمد زکی عقل[۴] و منصور صلاتی[۵]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۸)

چکیده

ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند (*Beet black scorch virus*, BBSV) یک ویروس جدید خاک زاد چغندرقند می‌باشد. به‌منظور ساخت سازه عفونت‌زای این ویروس و بررسی واکنش برخی ارقام چغندرقند به آن، نمونه‌های علائم ریشه ریشی در ریشه، از مزرعه‌ای در مشهد جمع‌آوری شد. در این نمونه با استفاده از آزمون زنجیره‌ای پلیمراز با ترانویسی معکوس دو ویروس BBSV و *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) ردیابی گردید. پس از خالص‌سازی و تکثیر ژنوم کامل BBSV، همسانه عفونت‌زای آن در ناقل pDrive ساخته شد. آرانای سنتز شده از همسانه عفونت‌زا توسط فاژ T7، برای آلوده‌سازی مکانیکی گیاه محک سلمه تره استفاده شد. به‌منظور آلوده‌سازی مکانیکی برگ گیاهچه‌های چغندرقند، از برگ‌های دارای علائم کلروتیک گیاه محک، به‌عنوان مایه تلقیح اولیه استفاده شد. در این تحقیق از ارقام چغندرقند داخلی شامل: شریف، آریا و شکوفا و ارقام خارجی شامل: Izabella، Pauletta و Dorothea، با تنوع ژنتیکی متفاوت کشت‌شده در شرایط گلخانه، استفاده شد. نتایج این بررسی نشان داد که BBSV می‌تواند سه هفته پس از مایه‌زنی، علائمی به‌صورت نقاط نکروتیک ریز روی برگ گیاهچه همه ارقام ایجاد نماید؛ بنابراین سازه عفونت‌زای ساخته‌شده می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مطمئن برای غربال مقدماتی ژرم‌پلاسم‌های چغندرقند (قبل از شروع برنامه‌های بهنژادی جهت تهیه ارقام مقاوم به این ویروس) تحت شرایط گلخانه، مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که تاکنون هیچ ژن یا ژن‌های مقاومی در چغندرقند نسبت به BBSV گزارش نشده است، می‌توان با استفاده از این روش سعی در یافتن منابع مقاومت به این ویروس در چغندرهای وحشی و زراعی نمود.

کلیدواژه: چغندرقند، ریزومانیا، سازه عفونت‌زا، ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند، مقاومت.

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehrvar@um.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد و مربی پژوهشی، بخش تحقیقات چغندرقند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

۲ و۳- دانشیار،گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۴- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵- استادیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

Construction of infectious clone of Mashhad isolate *Beet black scorch virus* and studying the reaction of some sugar beet cultivars to it under greenhouse conditions

J. Soltani Idliki[1], M. Mehrvar[2*], M. Zakiaghl[3], S.B. Mahmoudi[4], and M. Salati[5]

(Received: 24.7.2018; Accepted: 20.10.2019)

Abstract

Beet black scorch virus (BBSV) is a soil-borne virus infecting sugar beet. In order to construct an infectious full-length cDNA clone of Mashhad isolate (IR-Mash1), Iran (GenBank Accession no. MK092329), and studying reaction of some sugar beet cultivars, sugar beet roots with beard lateral root growth were collected from Mashhad field and subjected to total RNA extraction and then cDNA synthesis. PCR reaction was performed to amplify the whole genome of the virus were cloned to pDrive Cloning Vector. DNA was extracted from the plasmid vector. It was used as templates for run-off transcription in vitro by use of a T7 RNA polymerase. *Chenopodium quinoa* was inoculated under greenhouse conditions. Necrotic local lesions formed on *C. quinoa* (5 dpi) leaves were used as inoculation material for inoculation of the leaves of different sugar beet cultivars grown in the greenhouse. BBSV was inoculated by rubbing the sugar beet seedling leaves. Iranian cultivar including Sharif (susceptible check), Aria, Shokoufa and foreign cultivar including Pauletta KWS (tolerant to Rhizomania and sugarbeet cyst nematode), Isabella KWS (Double Resistant to Rhizomania) and Dorothea (tolerant to Rhizoctonia) cultivars were inoculated under greenhouse conditions. Pinpoint Symptoms appeared on the leaves of all cultivars after twenty days. The result showed that the virus produces similar symptoms on leaves of susceptible and resistant cultivars to Rhizomania. So, using infectious clone, possible to screening sugar beet germplasms as part of pre-breeding programs under greenhouse conditions and to find sources of resistance to the virus in sugar beet and wild beets.

Keywords: *Beet black scorch virus*, Infectious clone, Rhizomania, Resistance, Sugar beet

**Corresponding author's E-mail: mehrvar@um.ac.ir

1. Ph.D. student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad and Research Instructor, Sugar Beet Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.

2 and 3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

4. Associate Professor, Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karadj, Iran.

5. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Mashhad, Iran.

www.SID.ir

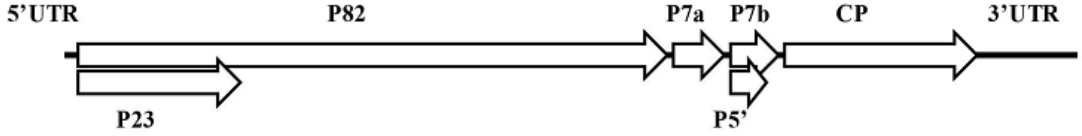
Archive of SID

مقدمه

کشت چغندرقند (*Beta vulgaris* L) در ایران تحت تأثیر عوامل بیماری‌زای متعددی است. بیماری ریزومانیا، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند در ایران و سراسر جهان است. ویروس‌های خاک زادی مانند *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV)، *Beet soil-borne virus* (BSBV) و *Beet virus Q* (BVQ) در ایجاد این بیماری نقش دارند. این ویروس‌ها با پروتیست *Polymyxa betae* منتقل می‌شوند(Tamada & Asher 2016). یکی دیگر از ویروس‌های خاک‌زاد چغندرقند سوختگی سیاه برگ چغندرقند (*Beet black scorch virus*, BBSV) از جنس *Betanecrovirus* و خانواده *Tombusviridae* است (Cao *et al.* 2002) که در طبیعت توسط زئوسپورهای قارچ *Olpidium brassicae* منتقل می‌شود (Junxi *et al.* 1999). BBSV پیکره‌های بیست‌وجهی داشته و ژنوم آن RNA تک‌رشته‌ای مثبت بوده که دارای شش چارچوب ژنی (ORF) است. با اینکه ژنوم BBSV فاقد ساختارهای CAP در انتهای ۵' و PolyA در انتهای ۳' می‌باشد(شکل ۱)، ولی به دلیل داشتن ساختارهای ثانویه در انتهای 3'UTR، تکثیر و ترجمه ژن‌های آن با کارآیی بالا انجام می‌گیرد (Shen and Miller 2007).

BBSV برای اولین بار در اواخر سال ۱۹۸۰ در مغولستان و چین شناسایی شد(Liu and Xian 1995). این ویروس به علت ایجاد علائم سوختگی و سیستمیک شدن در برگ‌ها بنام سوختگی سیاه برگ نامیده شد. سپس از آمریکا (Weiland *et al.* 2007) و برخی کشورهای اروپایی (Gonzalez-Vazquez *et al.* 2009) نیز گزارش شد. کوئنیگ و همکاران برای اولین بار، این ویروس را از مزارع کشت چغندرقند تربت‌حیدریه در خراسان رضوی گزارش نمودند (Koenig & Valizadeh 2008). در تحقیقی دیگر، مهرور و همکاران (Mehrvar *et al.* 2009) نشان دادند که بعضی از جدایه‌های این ویروس در مزرعه هیچ‌گونه علائم سوختگی بر روی برگ چغندرقند نشان نمی‌دهند، اما همراه BNYVV موجب تولید ریشه‌های فرعی فراوان می‌گردند. در حال حاضر وجود BBSV در مزارع چغندرقند استان‌های خراسان رضوی، شمالی، جنوبی، لرستان، اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، قزوین، همدان، کرمان، کرمانشاه و زنجان تأیید گردیده است، اما تاکنون از استان فارس گزارش نشده است (Mehrvar *et al.* 2009).

ساخت سازه عفونت‌زا یک روش ضروری و قدرتمند برای مطالعه بیماری‌زایی ویروس‌های دارای آران ای است که می‌تواند به تجزیه و تحلیل فرآیند پیچیده آلودگی توسط ویروس و تعامل گیاه، ویروس و ناقل آن کمک کند. سازه‌های عفونت‌زای ویروس‌های گیاهی طیف کاربردی گسترده‌ای دارند. در حوزه بیماری شناسی گیاهی، ساخت این سازه‌ها، زمینه را برای غربالگری مقاومت ژنوتیپ‌های متفاوت گیاهی فراهم می‌سازد (Brewer *et al.* 2018).



شکل ۱. ساختار ژنوم کامل ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند اقتباس از مقاله(Xu *et al.* 2016)

Fig. 1. The structure of the complete genome of the *Beet black scorch virus*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در این بررسی برای ردیابی ***Beet necrotic yellow vein virus, Beet soil-borne virus***، ***Beet virus Q*** و ***Beet black scorch virus*** در ریشه چغندرقند

Table 1. Specific primers used for the detection of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soil-borne virus*, *Beet virus Q* and *Beet black scorch virus* RNA segments

Primer	Sequence (5' to 3')	Amplification length	Reference
BNYVV2-F	ACATTTCTATCCTCCTCCAC	545bp	Meunier *et al.* 2003
BNYVV2-R	ACCCCAACAAACTCTCTAAC		
BSBV2-F	CTTACGCTGTTCACTTTTATGCC	399bp	
BSBV2-R	GTCCGCACTCTTTTCAACTGTTC		
BVQ1-F	GCTGGAGTATATCACCGATGAC	292bp	
BVQ1-R	AAAATCTCGGATAGCATCCAAC		
BBSVf	ATTAGATCCCACATCCTGGTGTGGTTAATC	315bp	Mehrvar *et al.* 2009
BBSVr	GGGCACCTGGAAGACCAGGTATATAAG		

اخیراً از سازه عفونت‌زای *Mungbean yellow mosaic virus* (Sudha *et al.* 2013) و *Mungbean yellow mosaic india virus* (Bag *et al.* 2014) به ترتیب به‌منظور غربال ژنوتیپ‌های مقاوم ماش (Mung bean) و عدس سیاه (Urad bean) استفاده شده است. بر اساس بررسی‌های انجام‌شده، تاکنون در دنیا، هیچ منبع دارای ژن یا ژن‌های مقاومت به BBSV شناسایی نشده و از طرف دیگر واکنش ارقام چغندرقند در برابر سازه عفونت‌زای BBSV مورد بررسی قرار نگرفته است. در نتیجه اهداف این تحقیق جداسازی، شناسایی و ساخت سازه عفونت‌زای BBSV و بررسی واکنش برخی از ارقام چغندرقند فاقد یا حامل ژن‌های مقاومت به ریزومانیا، نسبت به آن تعیین شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج آرانای کل آن‌ها

نمونه‌هایی از ریشه چغندرقند دارای علائم ریشه ریشی از یک مزرعه چغندرقند در مشهد جمع‌آوری و صد میلی‌گرم از بافت ریشه‌های فرعی هریک، در نیتروژن مایع با هاون چینی پودر شد. آرانای کل آن‌ها با استفاده از کیت RNeasy Plant Mini Kit، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده(Qiagen-Germany) استخراج شد، پنج میکرولیتر از آن برای بررسی‌های کمی و کیفی در معرض ژل الکتروفورز قرار گرفت.

ردیابی ویروس‌های خاک زاد در ریشه چغندرقند

در این مطالعه، به منظور ردیابی ویروس‌های BSBV، BVQ و BNYVV از روش‌های آزمون زنجیره‌ای پلیمراز با ترانویسی معکوس چندگانه (Multiplex RT-PCR) پیشنهاد شده توسط مونیه و همکاران (Meunier et al. 2003) و تکی (Simplex RT-PCR) برای BBSV استفاده شد. برای ساخت دی‌ان‌ای مکمل (cDNA) هر ویروس از آغازگر معکوس اختصاصی آن ویروس به ترتیب شامل: BSBV2r، BVQ1r، BNYVV2r و BBSVr (هر یک با غلظت ۱۰ میکرومولار، جدول ۱) و کیت Easy™ cDNA Synthesis Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (پارس طوس) استفاده شد. آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با استفاده از سه جفت آغازگر مستقیم و معکوس اختصاصی طراحی‌شده توسط مونیه و همکاران (۲۰۰۳) شامل: جفت آغازگر BNYVV2 که قطعه ۵۴۵ جفت بازی از ژن کد کننده پروتئین p75 در RNA2

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس BNYVV، جفت آغازگر BSBV2 که قطعه ۳۹۹ جفت بازی از RNA2 ویروس BSBV و جفت آغازگر BVQ1 که قطعه ۲۹۲ جفت بازی از RNA1 ویروس BVQ را تکثیر می‌کنند (جدول ۱)، انجام شد. آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دو میکرولیتر از cDNA ساخته‌شده، به همراه یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس (هر یک با غلظت ۱۰ میکرومولار) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش *Taq* DNA Polymerase Master Mix RED-Ampliqon در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش چرخه دمایی شامل: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه متوالی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای دو دقیقه و در نهایت مرحله گسترش نهایی برای پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. برای ردیابی BBSV، آزمون زنجیره‌ای پلیمراز تکی برای تکثیر قطعه ۳۱۵ نوکلئوتیدی ناحیه انتهای 3'UTR ژنوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BBSVf و BBSVr (جدول ۱) انجام شد. این آزمون با برنامه دمایی شامل: سه دقیقه به منظور واسرشتگی ابتدائی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در انتها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکمیل ساخت رشته مکمل، اجرا شد.

ساخت دی‌انای مکمل (cDNA) ژنوم BBSV

برای ساخت دی‌انای مکمل این ویروس، به دو میکرولیتر آرانای کل استخراج‌شده، یک میکرولیتر از آغازگر اختصاصی معکوس (BBSVrev) با غلظت دو میکرومولار و یک میکرولیتر dNTP Mixture(10 mM each) اضافه شد. حجم نهایی واکنش، ده میکرولیتر در نظر گرفته شد. مخلوط آماده‌شده به مدت ۵ دقیقه در ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس با افزودن یک میکرولیتر آنزیم نسخه‌بردار معکوس PrimeScript Reverse Transcriptase (200u)شرکت تاکارا، چهار میکرولیتر بافر PrimeScript buffer(5X) و پنج میکرولیتر آب دیونیزه، حجم نهایی مخلوط به ۲۰ میکرولیتر رسانده شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه برای مهار آنزیم نسخه‌بردار معکوس، واکنش حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از سه میکرولیتر از دی‌انای مکمل ساخته‌شده BBSV در مرحله قبل به همراه دو میکرولیتر از آنزیم PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(2.5U/50µl) شرکت تاکارا، ده میکرولیتر از بافر PrimeSTAR GXL Buffer (5X)، چهار میکرولیتر از dNTP Mix (2.5mM each)، ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای مستقیم و معکوس (هر یک با غلظت ۱۰ میکرومولار)، با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش از آغازگرهای مستقیم حاوی توالی پروموتور T7 در انتهای ۵ پرایم با یک نوکلئوتید گوانین (BBT7fwd) و معکوس (BBSVrev) (Weiland *et al.* 2007) که توانایی تکثیر ژنوم ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند ۳۶۴۴ نوکلئوتید را داراست، استفاده شد (جدول ۲). آشکارسازی محصول واکنش با الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد حاوی رنگ FluoroVue™ Nucleic Acid Gel Stain(10000X) انجام

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در این بررسی برای تکثیر کل ژنوم ویروس BBSV

Table 2. Specific primers used for the amplification of the whole genome of *Beet black scorch virus*

Primer	Sequence (5' to 3')	Reference
BBT7fwd	TAATACGACTCACTATAG*AAGAAACCTAACCAGTTTCTCG	Weiland *et al.* 2007
BBSVrev	GGGCACCTGGAAGACCAGGTATATAAG	

*- توالی پروموتور T7 به همراه یک نوکلئوتید گوانین که در رونوشت آرانای شرکت دارد.

- T7 promoter is underlined followed by the first nucleotide (G) incorporated into transcript RNAs.

و سپس با استفاده از دستگاه Gel-Doc(AlphaImager (Mini-USA، عکس‌برداری شد. دی‌ان‌ای کامل تکثیر یافته BBSV با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction Kit، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Qiagen-Germany) خالص گردید.

همسانه سازی ژنوم ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند

ژنوم کامل ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند درون ناقل pDrive Cloning Vector بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Qiagen-Germany) الحاق شد و در سلول‌های مستعد باکتری *Escherichia coli* سویه $DH_5\alpha$ همسانه سازی شدند. جهت غربالگری و تأیید وجود ژنوم BBSV در پرگنه‌های سفیدرنگ، روش کلونی پی‌سی‌آر (Colony PCR) با آغازگرهای مستقیم و معکوس عمومی pUC-M13 ناقل به کار گرفته شد. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت PrimePrep Plasmid DNA Isolation Kit بر اساس دستورالعمل شرکت آن (GenetBio-Korea)، استخراج شد و توالی یابی قطعه همسانه شده توسط شرکت ماکروژن (سئول، کره جنوبی) صورت گرفت.

هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب حاوی DNA کامل BBSV

هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pDrive Cloning Vector حاوی دی‌ان‌ای کامل BBSV با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sal*I (Takara-Japan) انجام شد. دی‌ان‌ای ویروس با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Qiagen-Germany) از ژل آگارز استخراج و از آن برای رونوشت برداری آرانای (Transcription) ویروس استفاده شد.

رونوشت برداری آرانای ژنوم کامل BBSV در آزمایشگاه (*In vitro*)

جهت رونوشت برداری آرانای ژنوم کامل BBSV از دی‌ان‌ای کامل به‌دست‌آمده از مرحله قبل، از کیت T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System استفاده شد و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آن (Promega, USA) انجام گردید. آشکارسازی آرانای ژنوم کامل رونوشت برداری شده با الکتروفورز (مطابق قبل) انجام و عکس‌برداری شد.

آلوده‌سازی گیاه محک در شرایط گلخانه با ژنوم رونوشت برداری شده BBSV

۲۰ میکرولیتر از آرانای رونوشت برداری شده BBSV با غلظت ۱۵۰ نانوگرم در میکرولیتر با ۵۰ میکرولیتر از بافر (50 mM Glycine; 30 mM K2HPO4, 1% GKP (Bentonite; 1% Celite با اسیدیته ۹/۲ (Weiland *et al.*, 2007)، در میکروتیوب استریل (نیم میلی‌لیتر) بر روی یخ مخلوط شد و ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط برای

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲. علائم ایجاد شده توسط ویروس‌های BBSV و BNYVV روی ریشه و برگ چغندرقند در مزرعه مشهد، راست: تولید ریشه فرعی فراوان و عدم رشد کافی ریشه اصلی، چپ: سوختگی برگ‌ها، پیچش آن‌ها به سمت داخل و مرگ کامل

Fig.2. Right: Beet exhibiting severe BNYVV and BBSV symptoms and possessing a fibrous root was found to harbor the virus and weakness at the root. Left: Black burn in sugar beet leaves, inwardly-curled leaves and destruction of leaves in Mashhad farms.

آلوده‌سازی مکانیکی هر برگ جوان گیاه محک (*Chenopedium quinoa*) در شرایط گلخانه (دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) استفاده شد. پنج روز پس از مایه‌زنی گیاه محک، برگ‌های دارای علائم کلروز و نکروز جمع‌آوری شدند. تعدادی از برگ‌های آلوده در فریزر با دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و تعدادی دیگر نیز پس از خشک‌کردن در دمای اتاق، در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک گرم از برگ سلمه آلوده تازه در ده میلی‌لیتر بافر فسفات یک‌دهم مولار با اسیدیته هفت در هاون چینی سترون، پودر شد. مخلوط آماده‌شده به همراه مقداری از پودر آزمایشگاهی سلیت (شرکت سیگما)، بر روی برگ گیاهچه‌های ارقام مختلف چغندرقند (چهار تا شش برگی) کشت‌شده در گلخانه مایه‌زنی مکانیکی شدند. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده، در شرایط گلخانه نگهداری شدند. ارقام چغندرقند مورد بررسی در این تحقیق از نظر ژنتیکی و مقاومت به بیماری ویروسی ریزومانیا (ژن‌های *Rz1* و *Rz2*) متفاوت بودند. ارقام داخلی شامل شریف (فاقد هرگونه ژن مقاومت) به‌عنوان شاهد حساس، آریا و شکوفا دارای ژن مقاومت به ریزومانیا (*Rz1*) و نماتد سیستی چغندرقند (*Hs1*$^{pro-1}$) و ارقام خارجی شامل: Pauletta (دارای ژن‌های مقاوم *Rz1* و *Hs1*$^{pro-1}$)، Izabella (دارای هر دو ژن مقاوم *Rz1* و *Rz2*) و Dorothea (ژن *Rz1*) بودند. ارقام یادشده در دو عدد گلدان (دو تکرار) حاوی خاک و ماسه سترون (به نسبت یک‌به‌یک) و در هر گلدان چهار بوته کشت‌شده بودند.

نتایج و بحث

ویروس‌های متعددی روی ریشه چغندرقند ایجاد بیماری می‌کنند، گمان بر این است که بیماری ریزومانیا با ایجاد ریشه‌های فراوان روی ریشه اصلی چغندرقند، حاصل مشترک تعامل بین ویروس‌های مختلف ازجمله BNYVV، BVQ، BSBV و BBSV باشد.

در این مطالعه، در نمونه‌های ریشه و برگ چغندرقند جمع‌آوری‌شده از مزرعه با علائم سوختگی برگ‌ها و پیچش آن‌ها به سمت داخل، عدم رشد کافی ریشه، نکروز آوندی در ریشه و ریشه ریشی (شکل ۲)، آلودگی‌های دوگانه BBSV با BNYVV و یا چندگانه با سایر

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳. علائم برگی بیماری ریزومانیا در مزرعه آلوده مشهد، چپ: زردی برگ‌های رقم حساس چغندرقند، راست: نکروز رگبرگ چغندرقند

Fig. 3. Rhizomania foliar symptoms in Mashhad farm. Right: Systemic foliar symptoms with necrosis of leaves veins. Left: Yellowing leaves of rows of susceptible sugar beets in farm.

ویروس‌های خاک زاد دیگر چغندرقند بررسی گردید. نتایج واکنش پلیمراز تکی برای BBSV و چندگانه برای سایر ویروس‌ها در ریشه و برگ نشان داد که ریشه‌ها به BVQ و BSBV آلودگی ندارند، اما در آن‌ها BBSV و BNYVV شناسایی شدند. بنابرتحقیقات انجام‌شده در سال ۲۰۰۹ توسط مهرور و همکاران از ۲۰۰ نمونه‌ی جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف کشت چغندرقند در ایران ۳/۷ درصد هم‌زمان به BNYVV، BVQ، BSBV و BBSV و فقط ۷/۴ درصد آن‌ها به دو ویروس BBSV و BNYVV آلوده بودند. برخلاف نتایج به‌دست‌آمده در ریشه، بررسی در برگ‌های دارای علائم سوختگی، هیچ‌یک از ویروس‌های ذکرشده، ردیابی نگردید. اگرچه در صورت مساعد شدن شرایط محیطی (اواخر شهریورماه) و افزایش غلظت ویروس، BNYVV در گیاه سیستمیک شده و در رگبرگ‌ها تجمع پیدا می‌کند و موجب نکروز رگبرگ‌ها و درنهایت مرگ کل برگ می‌گردد (شکل ۳)؛ اما بر اساس بررسی منابع انجام‌شده، تاکنون سیستمیک شدن BBSV در گیاه چغندرقند در مزرعه یا گلخانه گزارش نشده است.

در مطالعات قبلی انجام‌شده توسط مهرور و همکاران (۲۰۰۹) و ولی زاده و همکاران (۲۰۰۸) سوختگی برگ ناشی از این ویروس‌ها را در چغندرقند گزارش ننمودند؛ اما طی چند سال اخیر در مزارع چغندرقند آلوده به ریزومانیا، سوختگی برگ چغندرقند بخصوص در ارقام چغندرقند فاقد ژن مقاومت به بیماری ریزومانیا بیشتر مشاهده می‌شود (تجربیات شخصی). گمان می‌رود که این علائم مربوط به BBSV باشد. مقایسه علائم مزرعه‌ای جدایه مشهد با آنچه در مورد علائم ایجادی توسط سایر جدایه‌های دنیا گزارش‌شده است، نشان می‌دهد که این جدایه مشابه جدایه‌های چین (Xu *et al.* 2016)، سبب ایجاد سوختگی برگ و از بین رفتن آن بعد از یک هفته می شود. این جدایه مانند بقیه جدایه‌ها موجب نکروز بافت آوندی در ریشه و تولید ریشه‌های فرعی روی ریشه اصلی چغندرقند می‌شود. محققین در آمریکا و اروپا بیان کردند که جدایه‌های آمریکایی و اروپایی BBSV، بدون ایجاد علائم سوختگی سیاه در برگ و نکروز در بافت آوندی ریشه چغندرقند، موجب تشدید تکثیر ریشه‌های فرعی روی ریشه اصلی می‌شوند (Weiland *et al.* 2007; Gonzalez-Vazquez *et al.* 2009) (جدول ۳). مطالعات اخیر نشان داده است که تغییرات آمینواسیدها در پروتئین پوششی این ویروس موجب بروز علائم مختلف در گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. مقایسه جدایه‌های ایرانی، آمریکایی، چینی و اروپایی BBSV بر اساس علائم و آلودگی روی برگ و ریشه چغندرقند

Table 3. Comparison of Iranian, American, Chinese and European BBSV isolates based on symptoms and contamination on sugar beet leaves and roots

Row	Isolate	Black scorch in field	Necrosis of root	Root proliferation	Accompanied by BNYVV
1	Mashhad (MK092329)	+	+	+	+
2	China (AF452884)	+	+	-	-
3	USA (EF153268)	-	-	+	-
4	Europe	-	+	+	-

میزبان می‌گردد (Wang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2011). محققین چینی با مطالعه بر روی توالی اسیدآمینه‌های ۱۳-۴ ($K^4RNKGGKKSR^{13}$) ناحیه N-terminal پروتئین پوششی BBSV، که غنی از اسیدآمینه‌های لایزین (K) و آرژینین (R) است، بیان کردند که این توالی به طور مستقیم درحرکت ویروس در گیاه و ایجاد علائم نقش مهمی دارد (Zhang *et al.* 2013). **در این** بررسی، جدایه‌های چین (AF452884)، آمریکا (EF153268) و مشهد (MK092329) از نظر تغییرات در اسیدآمینه‌های توالی یاد شده، مقایسه شدند و نتایج نشان داد که جدایه مشهد در اسیدآمینه‌های شماره ۱۰ و ۱۲ با جدایه چین (به ترتیب اسیدآمینه‌های آرژینین به جای لایزین و ترئونین به جای سرین) و شماره‌های ۹ و ۱۰ با جدایه آمریکا (به ترتیب اسیدآمینه‌های گلایسین به جای سرین و آرژینین به جای لایزین) متفاوت است (جدول ۴). علاوه بر این، پوشش پروتئینی جدایه مورد بررسی در اسیدآمینه‌های شماره ۴۸، ۵۶، ۹۳، ۹۹، ۱۵۴، ۱۵۸ و ۲۰۷ نیز با جدایه‌های آمریکا و چین اختلاف نشان داد. با توجه به اهمیت پروتئین یاد شده در ایجاد علائم، برهمکنش ویروس-میزبان و ویروس با سایر ویروس‌ها، شاید بتوان تنوع رفتاری BBSV را در تفاوت آمینواسیدهای این ناحیه جستجو کرد. برای بررسی آزمایشگاهی چنین تفاوت‌هایی نیاز به ساخت سازه عفونت‌زای ویروس می‌باشد. از سوی دیگر، بهنژادگران چغندرقند برنامه اصلاح ژنتیکی برای تهیه رقم مقاوم، با غربالگری ژرم پلاسم‌های مختلف آن آغاز می‌کنند. همچنین فرآیند نهایی تهیه و تولید بذر چغندرقند مقاوم، منوط به ارزیابی مقاومت به ویروس و غربالگری مزرعه‌ای آن است. با توجه به حضور همزمان چند ویروس در ریشه چغندرقند در مزارع آلوده، می‌تواند این ارزیابی را دچار خطا کند، چون احتمالاً یکی از عوامل

جدول ٤. مقایسه آمینواسیدها در پروتئین پوششی جدایه های ایرانی، آمریکائی، چینی و اروپایی

Table 4. Compare of amino acids in coat protein of Iranian, American, Chinese, and European BBSV isolates

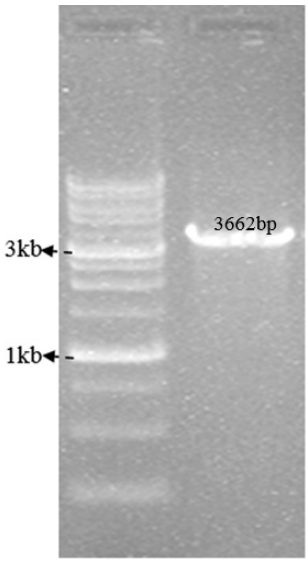
Row	Isolate	Amino acid number																
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	48	56	93	99	154	158	207
1	Mashhad (MK092329)	K	R	N	K	G	G	R	K	T	R	S	V	S	I	D	I	S
2	China (AF452884)	K	R	N	K	G	G	K	K	S	R	T	V	A	I	E	T	T
3	USA (EF153268)	K	R	N	K	G	S	K	K	T	R	T	I	A	V	E	T	S
4	Europe*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* توالی پوشش پروتئینی این جدایه در NCBI یافت نشد.

* Coat protein sequence isolates not found in NCBI.

www.SID.ir

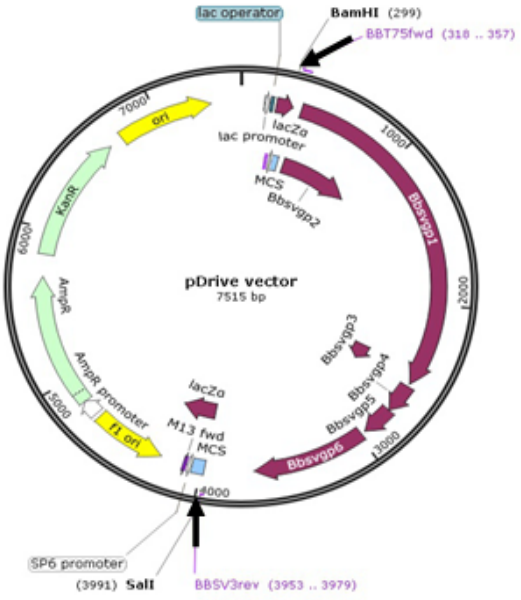
Archive of SID



شکل ٤. ژنوم کامل تکثیرشده ویروس سوختگی سیاه برگ چغندرقند دارای پرموتر T7

Fig. 4. Amplified Full-length genome of BBSV with T7 promoter

شکسته شدن مقاومت ارقام دارای ژن (*Rz1*) یا ژن‌های مقاومت (*Rz1+Rz2*) به BNYVV می‌تواند ناشی از حضورBBSV باشد (Koenig *et al.* 2009). اخیراً، محققین به این نتیجه رسیده‌اند که سازه‌های عفونت‌زای ویروس‌های گیاهی می‌تواند کاربردهای وسیعی در مطالعات بیولوژی و پزشکی داشته باشد، با اطمینان می‌توان از این سازه‌ها در مطالعه تعاملات گیاه با ویروس و غربالگری ژرم پلاسم‌ها به‌عنوان مقدمه‌ای برای برنامه بهنژادی گیاه برای مقاومت به ویروس استفاده نمود (Brewer *et al.* 2018). از این‌رو ساخت سازه عفونت‌زایBBSV می‌تواند نقش اساسی در مطالعات و بررسی‌های گلخانه‌ای مقاومت ارقام و برهمکنش این ویروس با سایر ویروس‌های خاک زاد چغندرقند ازجمله ویروس BNYVV (ساخت سازه عفونت‌زای هریک) با مایه‌زنی دو به دو یا مخلوطی از آن‌ها ایفا کند. در این راستا، دی‌ان‌ای کامل BBSV با ۳۶۶۴ نوکلئوتیدی دارای



شکل ٥. ساختار شماتیک pDrive Cloning Vector نوترکیب حاوی ژنوم کامل BBSV، (BBT7fwd= شروع ژنوم، = BBSVrevانتهای ژنوم) و جایگاه برشی دو آنزیم *Bam*HI و *Sal*I

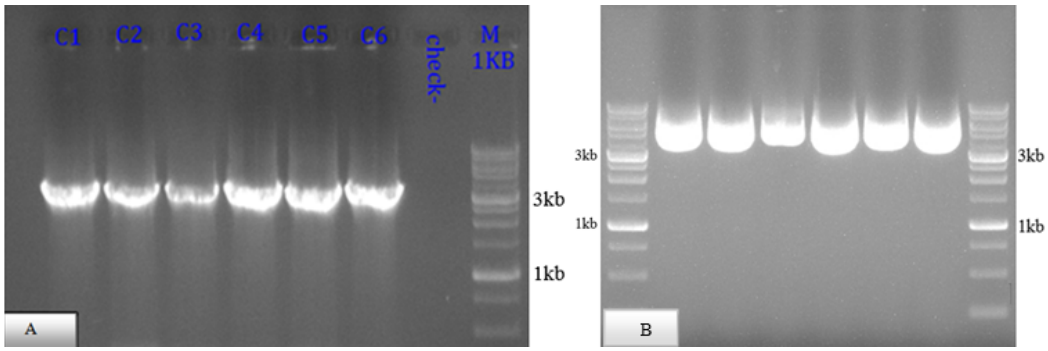
Fig.5. Schematic representation of the pDrive Cloning Vector recombinant with full-length BBSV and Restriction enzymes sites *Bam*HI and *Sal*I, (BBT7fwd=5'UTR, BBSVrev=3'UTR).

توالی فاژ T7 ساخته شد و پس از خالص‌سازی (شکل ۴)، از آن به‌عنوان قطعه الگو برای الحاق در ناقل pDrive Cloning Vector استفاده شد (شکل ۵). پس از همسانه-سازی در سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه $DH_5\alpha$، پلاسمیدهای نوترکیب استخراج و جهت غربالگری و تأیید وجود ژنوم BBSV، کلنی پی‌سی‌آر شدند، نتایج الکتروفورز، موفقیت‌آمیز بودن همسانه‌سازی را نشان داد (شکل ۶). پس از ساخت سازه عفونت‌زای جدایه BBSV مشهد و دریافت نتایج توالی یابی آن، این جدایه در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با شماره نمایه MK092329 و با نام IR-Mash1 به ثبت رسید.

نتایج نقوش الکتروفورزی یک میکرولیتر از آرای

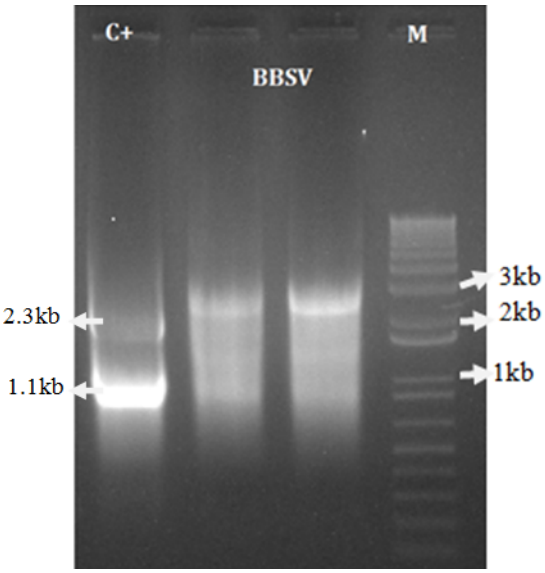
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦. الف: نقوش الکتروفورزی قطعه تکثیرشده ژنوم کامل BBSV از شش پرگنه سفید مجزا (C1-C6) در واکنش Colony PCR ب: پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده حاوی ژنوم BBSV، M: نشانگر وزن مولکولی هزار جفت باز (SMOBIO، تایوان).

Fig.6. A: Full-length genome of BBSV amplifide in Colony PCR reaction, B: Extracted recombinant plasmids containing the BBSV full-length genome, M: 1kb DNA ladder (SMOBIO, Taiwan).



شکل ۷. نقوش الکتروفورزی حاصل از رونوشت برداری از ژنوم BBSV با استفاده از کیت T7 RiboMAX™ Express، M: نشانگر وزن مولکولی هزار جفت باز (دنا زیست، ایران). C^+: کنترل مثبت استاندارد کیت (۱/۱ و ۲/۳ کیلو باز)

Fig.7. Result of transcription of viral genome BBSV using T7RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System kit, M: 1kb DNA ladder. C^+: pGEM® Express Positive Control (1.1kb, 2.3kb).

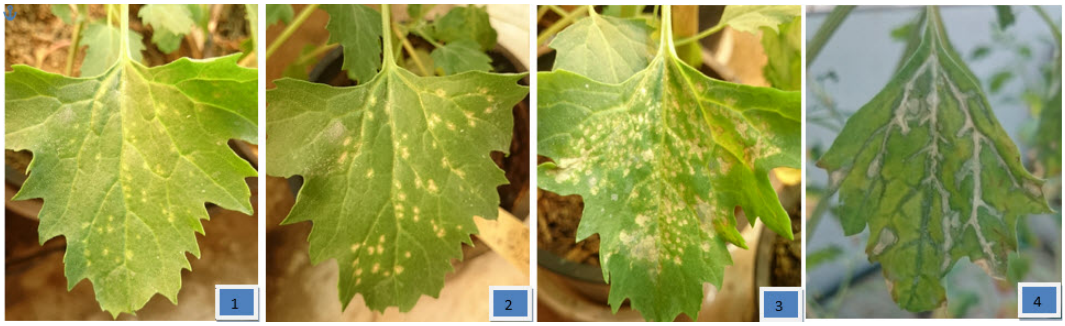
رونوشت برداری شده از سازه عفونت‌زای BBSV تهیه شده به روش آزمایشگاهی، براساس باند تشکیل‌شده تکثیر صحیح ژنوم با غلظت بالا را نشان داد (شکل ۷).

پس از اطمینان از صحت تکثیر نسخه‌های رونوشت برداری شده، برای بررسی عملکرد و کارآیی آن، روی گیاه محک مایه‌زنی مکانیکی گردید. سه روز بعد از مایه‌زنی بر روی برگ‌های جوان گیاه سلمه، اولین علائم کلروز روی برگ‌ها مشاهده گردید و در روز هفتم علائم به‌صورت لکه‌های موضعی نکروز بروز نمود و بعد از دو هفته با گسترش این علائم، برگ‌ها دچار نکروز شدید شدند. گاهی این علائم در برگ‌های آلوده گیاه سیستمیک شده و باعث ایجاد علائم موزاییک روی برگ و نکروز رگبرگ گردید (شکل ۸). ویلند و همکاران در سال ۲۰۰۷ با تلقیح مکانیکی جدایه BBSV-CO بر روی *C. quinoa* نتایج مشابهی گزارش نمودند؛ اما مهرور و همکاران در سال ۲۰۰۹ با تلقیح جدایه‌های BBSV-ksh1, BBSV-Sh1 از ایران، علائم سیستمیک بر روی برگ‌های گیاه *C. quinoa* گزارش نکردند.

چهار روز پس از مایه‌زنی برگ‌های سلمه، برگ‌های دارای علائم کلروز جمع‌آوری و به‌عنوان مایه تلقیح اولیه BBSV جهت مایه‌زنی برگ گیاهچه‌های ارقام چغندرقند در شرایط گلخانه استفاده شد. سه هفته پس از مایه‌زنی، نقاط نکروتیک ریز(Pinpoint necrotic spots)، روی

www.SID.ir

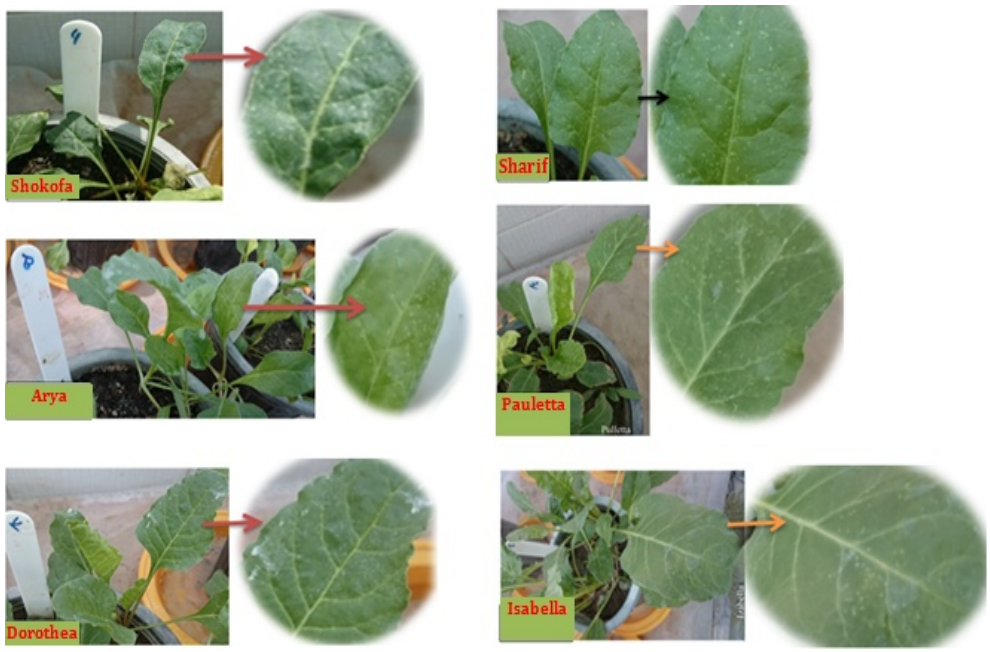
Archive of SID



شکل ۸. مایه‌زنی مکانیکی سازه عفونت‌زای BBSV روی برگ‌های *Chenopodium quinoa*. ٤-١: ایجاد علائم کلروز و نکروز به ترتیب: سه، پنج، هفت و چهارده روز پس از مایه‌زنی. ٤: گاهی ویروس در برگ آلوده سیستمیک شده و در رگبرگ‌ها حرکت کرده و موجب سفیدی آن می‌شوند.

Fig. 8. Mechanical inoculation of *Chenopodium quinoa* by infectious clone of BBSV. 1-4: Necrotic and chlorotic local lesions 3, 5, 7 and 14 days post-inoculation respectively. 4: In *C. quinoa*, the virus occasionally produced systemic symptoms in which cleared veins.

برگ‌های رقم شریف به عنوان رقم شاهد حساس، ارقام داخلی (آریا و شکوفا) و خارجی Pauletta (KWS-Germany)، Isabella (KWS-Germany) و Dorothea (Syngenta) ظاهر گردید (شکل ۹). با انجام آزمون زنجیره‌ای پلیمراز با ترانویسی معکوس (قطعه ۳۱۵ نوکلئوتیدی ناحیه انتهای ژنوم) مجدد، حضور BBSV در برگ‌های چغندرقند دارای علائم به اثبات رسید. در هیچ-یک از ارقام چغندرقند مورد بررسی، علائم سیستمیک



شکل ۹. نقاط کلروز ایجاد شده توسط سازه عفونت‌زای BBSV روی برگ‌های ارقام چغندرقند شامل: شریف (شاهد حساس)، آریا، شکوفا، دوروتی، پائولتا و ایزابلا در شرایط گلخانه

Fig. 9. Diffuse chlorotic lesions on the leaves of sugar beet cultivars Sharif (susceptible check), Aria, Shokofa, Dorothea, Pauletta and Isabella, by infectious clone BBSV inoculation under greenhouse conditions

www.SID.ir

Archive of SID

روی برگ آن‌ها مشاهده نگردید.

در دو دهه گذشته، ساخت سازه عفونت‌زای ویروس-های گیاهی به یک روش آزمایشگاهی استاندارد تبدیل‌شده است، هر سازه می‌تواند، یک ابزار عالی برای تحقیق در مورد عملکرد ژن‌های ویروسی و تعاملات بین ویروس و گیاه میزبان باشد. با ساخت سازه عفونت‌زای BBSV می‌توان، مقاومت تعداد انبوهی از ژرم پلاسم های وحشی و زراعی چغندرقند را در شرایط گلخانه، قبل از برنامه-ریزی برای فعالیت‌های بهنژادی و صرف هزینه بسیار زیاد، نسبت به این ویروس مورد ارزیابی قرارداد. از طرف دیگر می‌توان، تعامل این ویروس را با سایر ویروس‌های خاک زاد ریشه چغندرقند (با ساخت سازه عفونت‌زای هر یک) در ایجاد علائم روی گیاه و بررسی مولکولی مورد ارزیابی قرار داد.

سپاسگزاری

اجرای این تحقیق میسر نبود مگر با همکاری های بی شائبه ریاست و همکاران محترم بخش های تحقیقات گیاهپزشکی و چغندرقند مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند که بدین وسیله از زحمات کلیه این عزیزان تشکر می گردد.

منابع

Bag, M.K., Gautam, N.K., Prasad, T.V., Pandey, S., Dutta, M. and Roy, A. 2014. Evaluation of an Indian collection of black gram germplasm and identification of resistance sources to *Mungbean yellow mosaic virus*. Crop Protection 61:92–101.

Brewer, H.C., Hird, D.L., Bailey, A.M., Seal, S.E. and Foster, G.D. 2018. A guide to the contained use of plant virus infectious clones. Plant biotechnology journal, 16(4), pp.832-843.

Cao, Y., Cai, Z., Ding, Q., Li, D., Han, C., Yu, J. and Liu, Y. 2002. The complete nucleotide sequence of *Beet black scorch virus* (BBSV), a new member of the genus Necrovirus. Archives of virology, 147(12), pp.2431-2435

González-Vázquez, M., Ayala, J., García-Arenal, F. and Fraile, A. 2009. Occurrence of *Beet black scorch virus* infecting sugar beet in Europe. Plant disease, 93(1), pp.21-24.

Jiang, J., Zhang, J., Che, S., Yang, D., Yu, J., Cai, Z. and Liu, Y. 1999. Transmission of *Beet black scorch virus* by *Olpidium brassicae*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 21(4), pp. 525-528.

Koenig, R. and Valizadeh J. 2008. Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of *Beet black scorch virus*. Archives of Virology 153(7):1397–1400.

Liu, J. and Xian H. 1995. Preliminary report on *Beet black scorch virus*. China sugar beet 3:30–31.

Mehrvar, M., Valizadeh, J., Koenig, R. and Bragard, C.G. 2009. Iranian *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV): pronounced diversity of the p25 coding region in A-type BNYVV and identification of P-type BNYVV lacking a fifth RNA species. Archives of virology, 154(3), pp.501-506.

Meunier, A., Schmit, J.F., Stas, A., Kutluk, N. and Bragard, C. 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. Appl. Environ. Microbiol., 69(4), pp.2356-2360.

Petty, I.T.D., Hunter, B.G., Wei, N. and Jackson, A.O. 1989. Infectious *Barley stripe mosaic virus* RNA transcribed in vitro from full-length genomic cDNA clones. Virology, 171(2), pp. 342-349.

Shen, R. and Miller, W.A. 2007. Structures required for poly (A) tail-independent translation overlap with, but are distinct from, cap-independent translation and RNA replication signals at the 3′ end of *Tobacco necrosis virus* RNA. Virology, 358(2), pp.448-458.

Sudha, M., Karthikeyan, A., Nagarajan, P., Raveendran, M., Senthil, N., Pandiyan, M., Angappan, K.,

www.SID.ir

Archive of SID

Ramalingam, J., Bharathi, M., Rabindran, R. and Veluthambi, K. 2013. Screening of mungbean (Vigna radiata) germplasm for resistance to *Mungbean yellow mosaic virus* using agroinoculation. Canadian journal of plant pathology, 35(3), pp. 424-430.

Tamada, T. and Michael J. C. A. 2016. Ecology and Epidemiology. Pp. 155–71 in *Rhizomania*. Cham: Springer International Publishing.

Wang, X., Zhang, Y., Xu, J., Shi, L., Fan, H., Han, C., Li, D. and Yu, J. 2012. The R-rich motif of *Beet black scorch virus* P7a movement protein is important for the nuclear localization, nucleolar targeting and viral infectivity. Virus research, 167(2), pp.207-218.

Weiland, J.J., Van Winkle, D., Edwards, M.C., Larson, R.L., Shelver, W.L., Freeman, T.P. and Liu, H.Y. 2007. Characterization of a U.S. isolate of *Beet black scorch virus*. Phytopathology 97(10):1245–54.

Xu, J., Liu, D., Zhang, Y., Wang, Y., Han, C., Li, D., Yu, J.L. and Wang, X.B. 2016. Improved pathogenicity of a *Beet black scorch virus* variant by low temperature and co-infection with its satellite RNA. Frontiers in microbiology 7:1771.

Zhang, Y., Zhang, X., Niu, S., Han, C., Yu, J. and Li, D. 2011. Nuclear localization of *Beet black scorch virus* capsid protein and its interaction with importin α. Virus research, 155(1), pp.307-315.

Zhang, X., Zhao, X., Zhang, Y., Niu, S., Qu, F., Zhang, Y., Han, C., Yu, J. and Li, D. 2013. N-terminal basic amino acid residues of *Beet black scorch virus* capsid protein play a critical role in virion assembly and systemic movement. Virology journal, 10(1), p.200.

www.SID.ir