



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲

doi 10.22055/ppr.2023.18033

ردیابی هم‌زمان دو گونه ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندر قند و ویروس سوختگی سیاه چغندر قند با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوگانه

جمشید سلطانی ایدلیکی^{۱*} و محسن مهرور^۲

۱- *نویسنده مسوول: استادیار، بخش تحقیقات چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش

و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران (soltani_jam@yahoo.com)

۲- دانشیار، بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹

چکیده

تاکنون ویروس‌های رگبرگ زرد نکروتیک چغندر قند (Beet necrotic yellow vein virus, BNYVV) و سوختگی سیاه چغندر قند (Beet black scorch virus, BBSV) به‌طور مجزا در ریشه‌های آلوده از مزارع چغندر قند ایران ردیابی شده‌اند. هدف از این مطالعه ردیابی هم‌زمان دو ویروس ذکر شده به‌منظور صرفه‌جویی در زمان و انرژی در فرآیند تشخیص آلودگی بود. بدین منظور از سه روش استفاده شد. در روش اول (روش رایج): ویروس‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ترانویسی معکوس (RT-PCR) به‌وسیله آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر کدام و مجزا از یکدیگر روی ریشه آلوده ردیابی شدند. در روش‌های دوم و سوم، این دو ویروس به ترتیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ترانویسی معکوس به‌صورت تکی (Simplexrt-PCR) اما هم‌زمان در یک ترموسایکلر و به صورت دوگانه (DuplexRT-PCR) با به‌کارگیری دو جفت آغازگر اختصاصی ردیابی شدند. نتایج در روش‌های دوم و سوم نشان داد که با بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرهای اختصاصی (۵۶ درجه سانتی‌گراد) مبتنی بر ناحیه ژن کد کننده پروتئین پوششی، به ترتیب قطعات هدف ۴۵۳ و ۳۹۱ جفت بازی از ژنوم BNYVV و BBSV تکثیر می‌یابند. در نتیجه این دو روش جهت ردیابی هم‌زمان مناسب بوده و از نظر صرفه‌جویی در زمان و انرژی مقرون‌به‌صرفه است و همچنین قابلیت استفاده از آن‌ها به‌منظور تهیه نقشه پراکنش در مناطق کشت چغندر قند و نیز ارزیابی و شناسایی لاین‌های مقاوم چغندر قند در برنامه‌های بهنژادی در شرایط گلخانه وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: آغازگر، ریزومانی، ویروس سوختگی سیاه چغندر قند، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس

دبیر تخصصی: دکتر رضا الماسی

Citation: Soltani Idliki, J. & Mehrvar, M. (2023). Simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and *Beet black scorch virus* (BBSV) using Duplex Reverse Transcription-PCR method. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(1), 9-23. <https://doi.org/10.22055/ppr.2023.18033>.

مقدمه

ریزومانیای یکی از بیماری‌های مهم ویروسی چغندرقد است. این بیماری ابتدا در اوایل دهه ۵۰ میلادی در شمال ایتالیا گزارش شد (Canova, 1959). طی دهه‌های گذشته، این بیماری در تمام مناطق مهم کشت چغندرقد در آسیا، ایالات متحده و اروپا گسترش یافته است (Asher 1993; Tamada et al., 1999; Lennefors) (et al., 2000; Nielsen et al., 2001) و هم اکنون در اکثر نواحی کشت چغندرقد در دنیا، گسترش دارد (Liu & Lewellen 2005; Gilmer et al., 2017). این بیماری به عنوان یک بیماری مهم اقتصادی که باعث کاهش شدید عملکرد قند در دنیا می‌شود، شناخته شده است (Borodynko et al., 2009). این ویروس به عنوان مضرترین بیمارگر چغندرقد در نظر گرفته می‌شود که باعث کاهش جدی کمیت و کیفیت در محصول چغندرقد می‌شود و به دلیل محدودیت در روش‌های کنترلی موثر، مبارزه با آن بسیار دشوار است (Biancardi & Tamada 2016; EFSA PLH) (Panel, 2020). در آلودگی‌های شدید روی رقم حساس، عملکرد شکر بیش از ۸۰ درصد کاهش می‌یابد (Peltier et al., 2008; McGrann et al., 2009). عامل این بیماری، ویروس رگبرگ زرد نکروتیک چغندرقد^۱ است (Tamada, 1975) که توسط قارچ پلاسمودیوفورومیستی به نام *Polymyxa betae* Keskin که بافت ریشه چغندرقد را آلوده می‌کند، منتقل می‌شود (Keskin 1964; Tamada & Kondo, 2013). این ویروس عضوی از جنس *Benyvirus* و درون خانواده *Benyviridae* با پیکره‌های میله‌ای شکل و ژنوم چندبخشی است (Gilmer et al., 2017). ژنوم ویروس از چهار یا پنج ریبونوکلیک اسید (آران) تک‌لای^۲ با سنس مثبت^۳ تشکیل شده است که ۱۲

یا ۱۳ پروتئین را کد می‌کند (Lennefors 2006). این بیماری در ایران ابتدا از استان فارس گزارش شد (Izadpanah et al., 1996) و در حال حاضر تقریباً در تمام مناطق کشت چغندرقد کشور، گسترش دارد (Sohi & Maleki, 2004).

ویروس خاک‌برد سوختگی سیاه چغندرقد (BBSV) *Beet black scorch virus*، به جنس *Betanecrovirus* و تیره *Tombusviridae* تعلق دارد (Cao et al., 2002) که ناقل آن در طبیعت قارچ *Olpidium brassicae* می‌باشد (Junxi et al., 1999). این ویروس با پیکره‌ای بیست‌وجهی و ژنوم از نوع آران‌ای تک‌لا با سنس مثبت دارای شش چارچوب خوانش باز است. ژنوم ویروس BBSV برخلاف BNYVV، فاقد ساختار کلاهک^۳ و دنباله پلی آدنیلی^۴ است، ولی به دلیل داشتن ساختارهای ثانویه در ناحیه غیرکدشونده انتهای^۳ پرایم^۵ به نام افزاینده ترجمه مستقل و غیر وابسته به کلاهک^۱ به‌طور مؤثری عمل تکثیر و ترجمه ژن‌ها در آن انجام می‌گیرد (Shen & Miller, 2007). این ویروس برای اولین بار در اواخر دهه ۱۹۸۰ میلادی از مزارع چغندرقد چین شناسایی شد (Cui, 1988)، سپس از آمریکا (Weiland et al., 2006) و اسپانیا (González-Vázquez et al., 2009) نیز گزارش شد. کویینگ و ولی‌زاده برای اولین بار، این ویروس را از مزارع چغندرقد ایران (شهرستان تربت حیدریه، استان خراسان رضوی) گزارش کردند (Koenig & Valizadeh, 2008). وقوع BBSV در حال حاضر در مزارع چغندرقد خراسان بزرگ و استان‌های لرستان، اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، قزوین، همدان، کرمان، کرمانشاه و زنجان تأیید شده است (Mehrvan & Bragard, 2011; Samiei et al., 2017).

5- 3' untranslated regions (3'UTR)
6- Cap-Independent Translation Enhancers (CITEs)

1- Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)
2- Single strand RNA plus(ssRNA+)
3- Cap structure
4- 3'-poly(A)n tail

تاکنون تشخیص هم‌زمان BNYVV و BBSV گزارش نشده است. اگرچه محققین از روش بهبودیافته‌ای برای شناسایی پنج ویروس قرنطینه‌ای BBSV، BNYVV، *Eggplant mottled dwarf virus* (EMDV) و *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV) و *Rice yellow mottle virus* (RYMV) استفاده نمودند (Choi et al., 2013). با این وجود، آن‌ها از روش واکنش پلیمرز زنجیره‌ای معکوس چندگانه استفاده نکردند. روش‌های آزمایشگاهی دیگری برای شناسایی چند ویروس از جمله nested PCR (nPCR) و Real Time PCR وجود دارد (Morris et al., 2001)، اما آن‌ها به تجهیزات پیشرفته و گران‌قیمت‌تری نیاز دارند که در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل دسترس نیستند.

در این تحقیق سعی بر این شد که روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز همراه با ترانویسی معکوس دو گانه^۱ برای تشخیص هم‌زمان دو ویروس مهم خاک‌برد چغندر قند BBSV و BNYVV تنظیم گردد. این تحقیق به شناسایی هم‌زمان دو ویروس یادشده کمک خواهد کرد و برای شناسایی مزارع آلوده، تعیین استراتژی‌های مناسب برای مدیریت مزرعه مانند انتخاب ارقام مقاوم چغندر قند و همچنین شناسایی لاین‌های چغندر قند مقاوم به دو ویروس در برنامه‌های اصلاحی بسیار مفید خواهد بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و استخراج آران‌ای کل

از مزرعه تحقیقاتی ایستگاه تحقیقات طرق (مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی) ریشه‌های چغندر قند با علائم ریشه‌های فرعی فراوان روی ریشه اصلی همراه با نکروز آوندی جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند (شکل ۱). پس از شستشوی این ریشه‌ها و خشک کردن آن‌ها در دمای آزمایشگاه، ۲۰۰ میلی‌گرم از ریشه‌های فرعی با نیتروژن مایع در هاون چینی پودر شدند. استخراج آران‌ای

در طی دهه گذشته، پیشرفت فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و دیگر روش‌های تکثیر قطعه هدف از ژن یا ژنوم ویروس‌ها به‌عنوان یک روش کلیدی در تشخیص مولکولی شده است. در حال حاضر در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌عنوان یک فناوری غالب، به‌طور معمول استفاده می‌شود. استفاده از این فن در آزمایشگاه‌ها همراه با محدودیت‌های از جمله هزینه بسیار بالای آن روبروست. برای غلبه بر این کاستی‌ها و نیز افزایش ظرفیت تشخیصی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، نوع دیگری از آن به نام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش بیش از یک توالی هدف با افزودن بیش از یک جفت آغازگر مختلف، قابل تکثیر است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه بدون آسیب‌رسانی به ابزارهای آزمایشگاهی موجب صرفه‌جویی در وقت و افزایش فعالیت در آزمایشگاه می‌گردد. این تکنولوژی در تشخیص RNA بسیار موفق‌آمیز بوده است.

پیش از این، از روش واکنش پلیمرز زنجیره‌ای معکوس دوگانه برای تشخیص هم‌زمان سه ویروس *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)، *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) و *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) و (Viswanathan et al., 2008) و ویروس (AMV) *Apple mosaic virus* در دو گونه سیب *Crab apples* و *Apple rootstocks* (Watpade et al., 2013) و تشخیص هم‌زمان ویروس *Tomato* (TSWV) و *spotted wilt virus* (CSVd) و ویروئید *Chrysanthemum stunt viroid* (Juan & Velásquez, 2019) و شناسایی هم‌زمان دو ویروس موزاییک خیار *Cucumber mosaic virus* (CMV) و *spotted wilt* (TSWV) و *Tomato virus* از مزارع گوجه‌فرنگی ایران (Abadkhah et al., 2017) استفاده شده است؛ اما

زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ردیابی BNYVV با جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده (جدول ۱)، (Meunier et al., 2003) که قطعه ۵۴۵ جفت بازی از ژن کدکننده پروتئین P75 در قطعه ژنومی RNA2 ویروس را تکثیر می‌کند، انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دو میکرولیتر از دی‌ان‌ای مکمل ساخته شده، به همراه یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس (هر یک با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش کیت مستر میکس (Ampliqon-Denmark) Taq DNA Polymerase Master Mix RED حاوی Tris-HCl pH 8.5, (NH₄)₂SO₄, 3 mM MgCl₂, 0.2% Tween 20, 0.4 mM dNTPs, 0.2 units/μl Ampliqon Taq DNA polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش، چرخه دمایی شامل واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه متوالی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

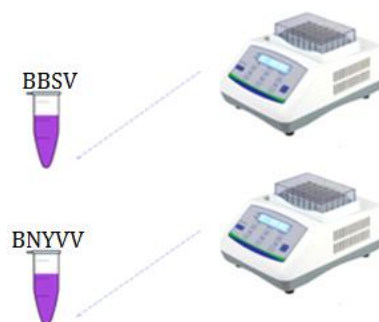
کل از بافت با استفاده از کیت استخراج آر‌ان‌ای (RNA RNeasy Mini Kit) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen-Germany) انجام شد و پنج میکرولیتر از آن برای بررسی‌های کمی و کیفی در ژل آگارز الکتروفورز شد.

ردیابی و شناسایی دو ویروس BNYVV و BBSV

به منظور ردیابی هم‌زمان دو ویروس در ریشه‌های چغندر قند آلوده از سه روش به شرح ذیل استفاده گردید.

روش اول: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس تکی

ابتدا به منظور ردیابی جداگانه هر یک از ویروس‌های BBSV و BNYVV در نمونه‌های جمع‌آوری شده، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس تکی^۱ در دو مرحله متفاوت استفاده شد (شکل ۱). به منظور ساخت کتابخانه دی‌ان‌ای مکمل برای هر ویروس، از آغازگر معکوس اختصاصی آن ویروس به ترتیب شامل: BBSV1-r و BNYVV1-r (هر یک با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، جدول ۱) استفاده شد. واکنش ترانویسی معکوس با استفاده از کیت دو مرحله‌ای RevertAid Reverse Transcriptase و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo Scientific-USA) انجام شد. واکنش



شکل ۱- نمایی از روش اول به منظور ردیابی جداگانه هر یک از ویروس‌های BBSV و BNYVV در نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با ترانویسی معکوس تکی در دو مرحله مجزا.

Figure 1. A view of the first method: separate detection of each of the BNYVV and BBSV viruses in the collected samples using SimplexRT-PCR in two separate steps.

ترانویسی معکوس تکی گرادیانته^۱ برای BNYVV و BBSV به طور جداگانه ولی هم‌زمان با یک برنامه مشترک پی سی آر در یک دستگاه ترموسایکلر، دو میکرولیتر از دی‌ان‌ای مکمل ساخته شده از هر یک از ویروس‌ها، به همراه یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس (هر یک با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) مربوط به هر ویروس (جدول ۲) طراحی شده از توالی ژن کدکننده پروتئین پوششی (Choi et al., 2013) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش Taq DNA Polymerase Master Mix RED-Ampliqon مخلوط و با افزودن ۸/۵ میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه در حجم نهایی هر واکنش به ۲۵ میکرولیتر انجام شد. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر گرادیانته (BIO-Rad, USA) تحت شرایط زیر انجام پذیرفت (شکل ۲).

برای ردیابی BBSV، از دی‌ان‌ای مکمل سنتز شده با استفاده از آغازگر معکوس اختصاصی این ویروس به عنوان الگو و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکی برای تکثیر قطعه ۳۰۵ نوکلئوتیدی ناحیه انتهای غیرکد شونده ۳ پرایم ژنوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی BBSV1-f و BBSV1-r (Weiland et al., 2007) با غلظت ۱۰ میلی‌مولار استفاده شد (جدول ۱). این واکنش با برنامه دمایی سه دقیقه به منظور واسرشتگی اولیه 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 اجرا شد.

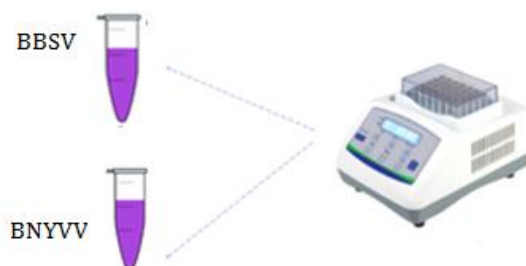
روش دوم: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس تکی گرادیانته

به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس تکی برای تشخیص جداگانه ویروس‌های خاک‌برد BNYVV و BBSV

Table 1. Primers used to simplex RT-PCR for the detection of sugar beet soilborne viruses (BNYVV and BBSV)

Primer	Sequence from 5' to 3'	Product size (bp)	TM(°C)
BNYVV1-f	ACATTTCTATCCTCCTCCAC	545	56
BNYVV1-r	ACCCCAACAAACTCTCTAAC		
BBSV1-f	ATTAGATCCCACATCCTGGTGTGGTAAATC	305	45
BBSV1-r	GGGCACCTGGAAGACCAGGTATATAAG		



شکل ۲- نمایی از روش دوم: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس تکی گرادیانته برای BBSV و BNYVV به طور جداگانه با یک برنامه مشترک پی‌سی‌آر در یک دستگاه ترموسایکلر

Figure 2. A view of the second method: Gradient Simplex RT-PCR for BNYVV and BBSV separately with a common program in a thermocycler.

غلظت ۱۰ میلی مولار) از هر ویروس (جدول ۲) به ۱۲/۵ میکرولیتر از کیت مسترمیکس حاوی Taq DNA Polymerase Master Mix RED-(Ampliqon, Tris-HCl pH8.5, (NH₄)₂SO₄, 3 mM Denmark) 0.2, 0.4 mM dNTPs, MgCl₂, 0.2% Tween 20 و دو میکرولیتر دی‌ان‌ای مکمل از هر ویروس، مخلوط و با افزودن ۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه شده حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش مذکور در دستگاه ترموسایکلر گرادینانت (BIO-Rad, USA) با شرایط زیر انجام شد (شکل ۳): پنج دقیقه به منظور واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چهار دمای اتصال آغازگرها شامل ۵۲، ۵۴، ۵۵ و ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ 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.

پنج دقیقه به منظور واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دماهای اتصال ۵۲، ۵۴ و ۵۶ 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. الکتروفورز محصول نهایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ژل آگاروز یک و نیم درصد و در بافر TAE انجام شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از Green View DNA Gel Stain انجام پذیرفت. اندازه باندهای حاصل با نشانگر مولکولی مقایسه شدند.

روش سوم: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس دوگانه گرادینانت هم‌زمان

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس دوگانه گرادینانت^۱ هم‌زمان جهت ردیابی ژنوم ویروس‌های BNYVV و BBSV، یک میکرولیتر از هر آغازگر مستقیم و معکوس (هر یک با



شکل ۳- نمای از روش سوم: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همراه با ترانویسی معکوس دوگانه گرادینانت هم‌زمان جهت ردیابی BBSV و BNYVV

Figure 3. A view of the third method: Gradient duplexRT-PCR at the same time to detect BNYVV and BBSV

جدول ۲- آغازگرهای استفاده‌شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکی و دوگانه در تشخیص هم‌زمان BBSV و BNYVV

Table 2. The RT-PCR primers used for detection of BNYVV and BBSV

Primer	Sequence (5' to 3')	TM(°C)	Product size (bp)
BNYVV2-f	TTCGGACGTCGTGAGTGTTA	53.7	391
BNYVV2-r	AAGAGCTTGAGCCAAACCAG	53.4	
BBSV2-f	TGCATTTTCTGTCGTTGGAG	53.3	453
BBSV2-r	CCAACATTAGTCGCAGCAGA	53.6	

1- Gradient duplexRT-PCR

ذکر شده می تواند دمای مناسب برای انجام این واکنش باشد. با وجود این، غلظت باند محصول پی سی آر در هر سه دمای اتصال بررسی شده برای ردیابی گونه BBSV بیشتر از گونه BNYVV بود.

بررسی نتایج نقوش الکتروفورز حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرز همراه با ترانویسی معکوس دو گانه گرادینت (روش سوم) نشان دهنده تفاوت در تشکیل و تفکیک محصولات پی سی آر در چهار درجه حرارت اتصال آغازگر متفاوت شامل ۵۲، ۵۴، ۵۵ و ۵۶ سانتیگراد بود (شکل ۸). به طوری که در دمای اتصال ۵۲ درجه سانتیگراد (چاهک شماره ۱) فقط باند حاصل از قطعه ۴۵۳ جفت بازی از ژنوم BBSV با غلظت زیاد ردیابی شد و تکثیر قطعه ۳۹۱ جفت بازی از ژنوم BNYVV مشاهده نگردید. در دمای اتصال ۵۴ درجه سانتیگراد (چاهک شماره ۲) قطعه ۳۹۱ جفت بازی از ژنوم BNYVV با غلظت خیلی ضعیف تشکیل شد و از قطعه ۴۵۳ جفت بازی حاصل از ژنوم BBSV که با غلظت زیاد تشکیل شده بود، تفکیک گردید. در دماهای اتصال ۵۵ و ۵۶ درجه سانتیگراد که به ترتیب در چاهک های شماره ۳ و ۴ بارگذاری شدند، قطعات ۴۵۳ و ۳۹۱ جفت بازی مربوط به ژنوم هر دو گونه ویروس مورد بررسی، تشکیل و به طور واضح از یکدیگر تفکیک شدند.

نتایج

از بوته های دارای علائم ریزمانیا نمونه برداری انجام شد. این علائم شامل زردی شدید برگ ها و تولید ریشه های فرعی فراوان روی ریشه اصلی بود و همچنین در برش طولی ریشه اصلی، بافت مردگی در بافت آوندی قابل مشاهده بود (شکل ۴).

در نمونه های مورد مطالعه، پس از استخراج آران ای کل (شکل ۵) و ساخت دی ان ای مکمل با استفاده از آغازگرهای معکوس اختصاصی BBSV و BNYVV به طور جداگانه، ردیابی ویروس های مذکور با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز همراه با ترانویسی معکوس انجام شد (روش اول). الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلی مرز در نمونه مورد بررسی، منجر به ردیابی قطعات ۵۴۵ و ۳۰۵ جفت بازی مورد انتظار به ترتیب برای گونه های BBSV و BNYVV شد (شکل ۶). نتایج این بررسی نشان دهنده آلودگی مخلوط BNYVV و BBSV به طور هم زمان در نمونه مورد بررسی بود.

نتایج واکنش زنجیره ای پلی مرز تکی گرادینت هم زمان برای ردیابی BBSV و BNYVV در یک دستگاه ترموسایکلر (روش دوم) نشان داد که هیچ تفاوتی در غلظت باندهای ایجاد شده با سه دمای اتصال ۵۲، ۵۴ و ۵۶ درجه سانتیگراد به ترتیب در چاهک های ۱، ۲ و ۳ وجود نداشت (شکل ۷). در نتیجه هریک از دماهای

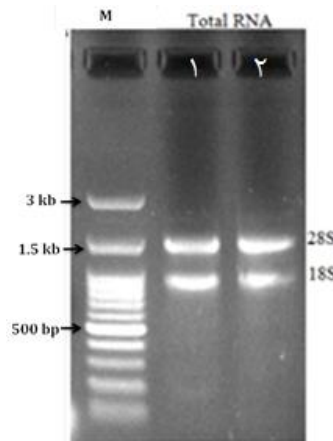


شکل ۴- علائم بیماری ریزومانیا در مزرعه تحقیقاتی مشهد. ۱. زردی یکنواخت در برگ های رقم حساس شریف (نوار سه خطی)، ۲. تغییر رنگ و چوبی شدن آوندهای ریشه در برش طولی، ۳. تولید ریشه های فرعی فراوان در اطراف ریشه اصلی.

Figure 4. Rhizomania symptoms in Mahhad research farm. Foliar symptoms: 1. Yellowing leaves of susceptible sugar beets (Sharif). Root symptoms: 2. Vascular system browning and lignification; 3. Proliferation of lateral rootlets (beard-like appearance of taproot)

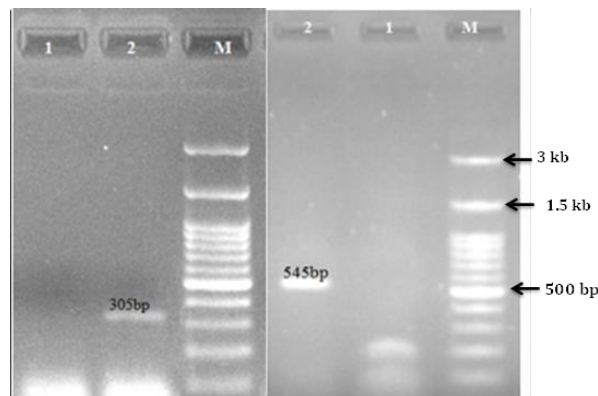
به‌دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکی به‌عنوان شاهد مثبت برای هر ویروس به‌طور جداگانه در چاهک‌های پنج (قطعه ۴۵۳ جفت بازی BBSV) و شش (قطعه ۳۹۱ جفت بازی BNYVV) بارگذاری شد که به‌وضوح باند مربوط به هر یک از قطعات ویروس‌ها را نشان داد.

باوجود این، در دمای اتصال ۵۶ درجه سانتیگراد شدت هر دو باند از وضوح بیشتری برخوردار بود. در نتیجه، نتایج این بررسی نشان داد که دمای اتصال بهینه برای انجام این واکنش برای تفکیک دو ویروس، دمای ۵۶ درجه سانتیگراد مناسب است (شکل ۸). به‌عنوان کنترل، محصول پی‌سی‌آر



شکل ۵- نمایی از آر‌ان‌ای کل استخراج‌شده از بافت دو نمونه ریشه چغندر قند آلوده بارگذاری شده بر روی ژل آگاروز، M: نشانگر اندازه دی ان ای صد جفت بازی (DM2300 ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder، تایوان).

Figure 5. A view of total RNA extracted from infected sugar beet root tissue loaded on agarose gel. M: 100 bp DNA ladder (DM2300 ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder, Taiwan).



شکل ۶- نقوش الکتروفورزی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکی همراه با ترانویسی معکوس در ژل آگاروز، راست: تکثیر قطعه ۵۴۵ جفت بازی از ناحیه TGB در قطعه ژنومی RNA2 از گونه BNYVV، چپ: نقوش الکتروفورزی در ژل آگارز حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکی همراه با ترانویسی معکوس، نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۳۰۵ جفت بازی از ناحیه 3'UTR ویروس BBSV. چاهک ۱: شاهد منفی چاهک ۲: محصول پی‌سی‌آر نمونه مورد بررسی، M: نشانگر اندازه دی ان ای (DM2300 ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder، تایوان).

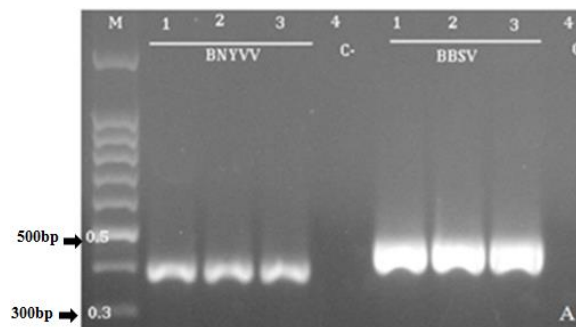
Figure 6. Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction with reverse transcription, right: Amplification of the 545 bp fragment from TGB region of RNA2 genome of BNYVV, left: Amplification of the 305 bp fragment from the 3'UTR region of BBSV. Lane 1: Negative control, Lane 2: PCR product of the studied sample, M: 100 bp DNA ladder (DM2300 ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder, Taiwan).

چغندر قند از جمله دو ویروس مهم ذکر شده در مناطق کشت این محصول در کشور، جهت تعیین میزان پراکنش و انتخاب استراتژی مدیریت آن‌ها نیاز به توسعه یک روش حساس و سریع برای تشخیص هم‌زمان آن‌ها با یکدیگر یا تشخیص هر یک به تنهایی در یک برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز وجود دارد. قبلاً روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه^۱ برای تشخیص هم‌زمان ویروس‌های مختلف بذر برد لویا (Alvarez-Díaz et al., 2019)، چند ویروس درختی (Asher 1993; Watpade et al., 2013) و همچنین برای ویروس‌های خاک‌برد سیب‌زمینی (Mumford et al., 2000) و غلات (Gitton et al., 1999) استفاده شده است. این روش برای شناسایی ویروس‌های خاک‌برد چغندر قند نیز از جمله اعضای جنس‌های *Pomovirus*، *Polerovirus* و *Benyvirus* و ناقلین آن‌ها (Meunier et al., 2003) با موفقیت استفاده شده است. تاکنون برای شناسایی هم‌زمان BNYVV و BBSV از یک برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز منفرد استفاده نشده است.

بحث

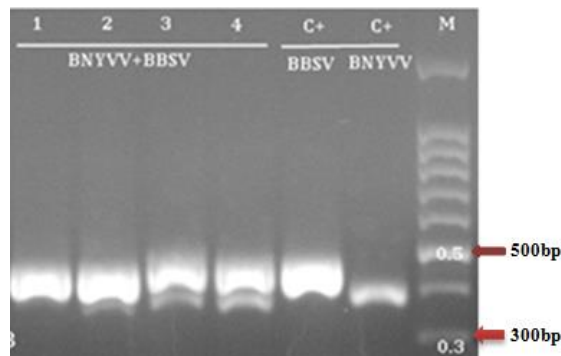
ویروس‌های خاک‌برد متعددی از جمله BNYVV، *Beet soil-borne* (BSBV)، *Beet virus Q* (BVQ) و BBSV روی ریشه چغندر قند ایجاد بیماری می‌کنند. این ویروس‌ها گاهی به صورت آلودگی مخلوط در مزرعه مشاهده می‌شوند (Schirmer et al. 2005; Ratti et al. 2005). در این تحقیق علائم نمونه‌های جمع‌آوری شده با علائم گزارش شده از بیماری ریزومانیا توسط سایر محققین (Bornemann et al., 2015) مطابقت داشت؛ اما در سال‌های اخیر 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 چغندر قند، موجب تشدید تکثیر ریشه‌های فرعی روی ریشه اصلی می‌شوند (Weiland et al., 2007; González-Vázquez et al., 2009).

بنا بر بررسی‌های انجام شده در سال ۱۳۸۸ توسط مهرور و همکاران در ۳/۷ درصد از نمونه‌ها هر چهار ویروس ردیابی شدند (Mehrvar and Bragard, 2011). با توجه به گسترش ویروس‌های خاک‌برد



شکل ۷- نقوش الکتروفورزی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکی گرادینت برای ردیابی BNYVV و BBSV در ژل آگارز با استفاده از سه درجه حرارت اتصال آغازگر برای هر ویروس: چاهک ۱: تیمار دمای اتصال ۵۲ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۲: تیمار دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی‌گراد و چاهک‌های ۳: تیمار دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد با یک برنامه پی‌سی‌آر مشترک هم‌زمان در یک دستگاه ترموسایکلر گرادینت. C: کنترل منفی، M: نشانگر اندازه دی‌ان‌ای (DM2100 ExcelBand™ 100 bp DNA Ladder، تایوان).

Figure 7. Agarose gel electrophoresis of gradient simplexRT-PCR (BNYVV and BBSV) using three annealing temperatures for each virus. The annealing temperature used to obtain the products for primer each virus and duplex was: 52 °C for lane 1; 54.0 °C for lane 2, and 55 °C for lanes 3, and 56 °C for lanes 4 Duplex. C: Negative control For BBSV and BNYVV lane 4. Lane M: 100 bp DNA ladder (DM2100 ExcelBand™ 100 bp, Taiwan).



شکل ۸- نقوش الکتروفورزی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دوگانه گرادینت با استفاده از دماهای اتصال آغازگر متفاوت برای دو گونه BBSV و BNYVV در ژل آگاروز. چاهک ۱: تیمار دمای اتصال ۵۲ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۲: تیمار دمای اتصال ۵۴ درجه سانتی‌گراد، چاهک ۳: تیمار دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد و چاهک ۴: تیمار دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی‌گراد. چاهک ۵: شاهد مثبت برای BBSV و چاهک ۶: شاهد مثبت برای BNYVV. M: نشانگر اندازه دی‌ان‌ای (DM2100 ExcelBand™ 100 bp DNA Ladder، تایوان)

Figure 8. Agarose gel electrophoresis of gradient duplexRT-PCR (BNYVV+BBSV) using three annealing temperatures for each virus. The annealing temperature used to obtain the products for primer each virus and duplex was: 52 °C for lane 1; 54.0 °C for lane 2, and 55 °C for lanes 3, 56 °C for lanes 4. C+: Positive control For BBSV lane 5. C+: Positive control For BNYVV lane 6. Lane M: 100 bp DNA ladder (DM2100 ExcelBand™ 100 bp, Taiwan).

به‌دست آمده از مرحله اصلاحی در مزرعه آلوده به بیماری‌های ویروسی است. با توجه به حضور هم‌زمان دو ویروس یادشده در ریشه چغندر قند در مزارع آلوده، می‌تواند این ارزیابی‌ها را دچار خطا کند. محققین معتقد هستند که یکی از عوامل شکسته شدن مقاومت ارقام چغندر قند دارای ژن (*Rz1*) یا ژن‌های مقاومت چغندر قند (*Rz1+Rz2*) به BNYVV می‌تواند ناشی از حضور BBSV باشد (Yilmaz 2016). در نتیجه ردیابی و شناسایی ویروس‌های همراه با BNYVV و بررسی خصوصیات مولکولی هر یک از آن‌ها قبل از ارزیابی ژنوتیپ‌ها در مزرعه آزمایشی ضروری به نظر می‌رسد. این مطلب می‌تواند در تشخیص نوع عامل بیماری و جلوگیری از خطا در ارزیابی مقاومت ارقام چغندر قند در مزرعه بسیار حائز اهمیت باشد.

نوروزی و همکاران (Norouzi et al., 2015) در تحقیقات خود نشان دادند که نتایج نشانگرهای SCAR-SNP که با ژن *Rz1* پیوستگی داشته، با نتایج

mRT-PCR مناسب‌ترین روش برای بررسی آلودگی‌های مخلوط^۱ است (Ratti et al., 2005). فواید این روش صرفه‌جویی در وقت و انرژی است؛ اما بهتر است از روش واکنش پلی‌مراز زنجیره‌ای معکوس دوگانه برای شناسایی دو ویروس استفاده شود. نتایج این مطالعه با نتایج سایر محققینی (Mehrvan 2009; Soltani et al., 2019) که اظهار نمودند در تعدادی از ریشه‌های آلوده جمع‌آوری شده از مزارع چغندر قند کشور، هر دو ویروس ردیابی شده است، کاملاً مطابقت داشت. بطوریکه شناسایی هم‌زمان دو ویروس با یک برنامه واکنش پلی‌مراز زنجیره‌ای معکوس امکان‌پذیر گردید. در این روش با شناسایی ساده محصولات PCR با الکتروفورز امکان تشخیص سریع‌تر و ارزان‌تر را فراهم می‌کند و نیازی به مراحل پیچیده مانند برش آنزیمی^۲، الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید^۳، شبیه‌سازی^۴ و تعیین توالی^۵ ندارد. یکی از فعالیت‌ها در زمینه تهیه و اصلاح بذر چغندر قند، ارزیابی و غربالگری مقاومت ژنوتیپ‌های

4- Cloning
5- Sequencing

1- Mixed infections
2- Restriction treatments
3-Polyacrylamide gel electrophoresis

برای ارزیابی کمی و کیفی در مزرعه، زمان فرایند اصلاحی را کاهش و سودمندی انتخاب را افزایش خواهد داد. از فواید دیگر این روش که می‌توان به آن اشاره نمود، شناسایی سریع مزارع آلوده به این دو ویروس با صرف انرژی، وقت و هزینه کمتر، تعیین استراتژی‌های مدیریت درست و مناسب از جمله انتخاب رقم مقاوم یا تناوب با گیاهان غیر میزبان است.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از همکاران بخش‌های تحقیقات چغندر‌قند و گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و همچنین از داوران این مقاله به خاطر نظرات و پیشنهادات ارزنده‌شان، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

ارزیابی مقاومت به ریزومانیا در مزرعه در جمعیت‌های اصلاحی حدود ۸۵ تا ۹۵ درصد توافق دارند. با توجه به آنکه روش‌های کلاسیک گزینش برای مقاومت به بیماری‌های ویروسی از جمله بیماری ریزومانیا از نوع فنوتیپی بوده و وابسته به شرایط اقلیمی و یکنواختی پراکنش ویروس در خاک است و این فعالیت تحقیقاتی می‌بایست در فصل زراعی انجام گیرد. در این فعالیت ممکن است بعضی گیاهان حساس بوده ولی مقاومت مزرعه‌ای از خود نشان دهند، از این رو با استفاده از این روش ردیابی هم‌زمان دو ویروس را در ریشه ژنوتیپ‌های اصلاحی جدید در گلخانه با دقت بالا به‌عنوان روش تکمیلی بعد از استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان گیاهان مقاوم را سطح ژنوتیپی شناسایی نمود. به این ترتیب با حذف ارزیابی مزرعه‌ای در طول فصل زراعی در مراحل اولیه و با کاهش تعداد ژنوتیپ‌ها

REFERENCES

- Abadkhah, M., Kashiha, Z., Koolivand, D., & Eini Gandomani, O. (2017). Simultaneous identification of *Cucumber mosaic virus* and *Tomato spotted wilt virus* from tomato fields and their phylogenetic analysis. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 40(1), 1-14.
- Abe, H., & Tamada, T. (1986). Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Japanese Journal of Phytopathology*, 52(2), 235-247.
- Alvarez-Díaz, J. C., Ortiz-Echeverry, B. A., & Velásquez, N. (2019). Duplex RT-PCR assay for simultaneous detection of TSWV and CSVd in chrysanthemum. *Journal of Virological Methods*, 266, 41-48.
- Asher, M. J. C. (1993). *Rhizomania In: The Sugar Beet Crop* (Cook DA and Scott RK, eds.).
- Biancardi, E., & Tamada, T. (Eds.). (2016). *Rhizomania*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Borodynko, N., Hasiow-Jaroszewska, B., & Pospieszny, H. (2009). Evidence for the presence of *Beet necrotic yellow vein virus* types A and B in Poland. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116(3), 106-108.
- Cai, Z. N., Chen, D. H., Wu, M. S., Cui, X. M., Yu, J. L., & Liu, Y. (1993). Identification of pathogenic virus of *beet black scorch* disease and detection by synthesized cDNA probes. *J. Beijing Agric. Univ*, 19, 112.

- Canova, A. (1959). Appunti di patologia della barbabietola. *Inf Fitopatol*, 9, 390-396.
- Cao, Y. Cai, Z., Ding, Q., Li, D., Han, C., Yu, J., & 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), 2431-2435.
- Chiba, S., Kondo, H., Miyanishi, M., Andika, I. B., Han, C., & Tamada, T. (2011). The evolutionary history of *Beet necrotic yellow vein virus* deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 207-218.
- Choi, H., Cho, W. K., Yu, J., Lee, J. S., & Kim, K. H. (2013). Highly specific detection of five exotic quarantine plant viruses using RT-PCR. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 99.
- Cui, X. (1988). An icosahedral virus found in sugar beet. *J Xinjiang Shihezi Agric College*, 10, 73-78.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M. A., Jaques Miret, J. A. & Bragard, C. (2020). Pest categorisation of *Beet necrotic yellow vein virus*. *EFSA Journal*, 18(12), e06360.
- Fujisawa, I., & Sugimoto, T. (1977). Transmission of *beet necrotic yellow vein virus* by *Polymyxa betae*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 43(5), 583-586.
- Gilmer, D., Ratti, C., & Consortium, I. R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Benyviridae. *Journal of General Virology*, 98(7), 1571.
- Gitton, F., Diao, A., Ducrot, O., Antoniow, J. F., Adams, M. J., & Maraite, H. (1999). A two-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection of *soil-borne wheat mosaic virus* and *wheat spindle streak mosaic virus* from France. *Plant Pathology*, 48(5), 635-641.
- González-Vázquez, M., Ayala, J., García-Arenal, F., & Fraile, A. (2009). Occurrence of *Beet black scorch virus* infecting sugar beet in Europe. *Plant Disease*, 93(1), 21-24.
- Guo, L. H., Cao, Y. H., Li, D. W., Niu, S. N., Cai, Z. N., Han, C. G., Han & Yu, J. L. (2005). Analysis of nucleotide sequences and multimeric forms of a novel satellite RNA associated with *Beet black scorch virus*. *Journal of Virology*, 79(6), 3664-3674.
- Harju, V. A., Skelton, A., Clover, G. R. G., Ratti, C., Boonham, N., Henry, C. M., & Mumford, R. A. (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(1), 73-80.
- Izadpanah, K., Hashemi, P., Kamran, R., Pakniat, M., Sahandpour, A., & Masumi, M. (1996). Widespread occurrence of rhizomania-like disease of sugarbeet in Fars. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 32(3/4).
- Junxi, J., Jingfeng, Z., Shaochen, C., Dajin, Y., Jialin, Y., Zhunan, C., & Yi, L. (1999). Transmission of Beet black scorch virus by *Olpidium brassicae*. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 21(4), 525-528.

- Keskin, B. (1964). *Polymyxa betae* n.sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Archiv. für Mikrobiologie*, 49, 348–374.
- Koenig, R., & Valizadeh, J. (2008). Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of *Beet black scorch virus*. *Archives of Virology*, 153(7), 1397-1400.
- Kuszala, M., Ziegler, V., Bouzoubaa, S., Richards, K., Putz, C., Guilley, H., & Jonard, G. (1986). *Beet necrotic yellow vein virus*: different isolates are serologically similar but differ in RNA composition. *Annals of Applied Biology*, 109(1), 155-162.
- Lee, J. S., Cho, W. K., Choi, H. S., & Kim, K. H. (2011). RT-PCR detection of five quarantine plant RNA viruses belonging to Potyand Tospoviruses. *The Plant Pathology Journal*, 27(3), 291-296.
- Lennefors, B. L. (2006). *Molecular breeding for resistance to rhizomania in sugar beets* (Vol. 2006, No. 2006: 106).
- Lennefors, B. L., Lindsten, K., & Koenig, R. (2000). First record of A and B type *Beet necrotic yellow vein virus* in sugar beets in Sweden. *European Journal of Plant Pathology*, 106(2), 199-201.
- Liu, H. Y., Sears, J. L., & Lewellen, R. T. (2005). Occurrence of resistance-breaking *Beet necrotic yellow vein virus* of sugar beet. *Plant Disease*, 89(5), 464-468.
- Liu, J., & Xian, H. (1995). Preliminary report on *Beet black scorch virus*. *China Sugar Beet*, 3, 30-31.
- McGrann, G. R., Grimmer, M. K., MUTASA-GÖTTGENS, E. S., & Stevens, M. (2009). Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Molecular plant pathology*, 10(1), 129-141.
- Mehrvar, M. (2009). Diversity of soil-borne sugar beet viruses in Iran. (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis, UCL, Louvain-la-Neuve, Belgium). https://dial.uclouvain.be/pr/boreal/object/boreal:28752/datastream/PDF_01/view.
- Mehrvar, M., & Bragard, C. (2011). Iranian diversity of *Beet black scorch virus* and satellite. *Proceedings of the Eighth Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors, Louvain-La-Neuve, Belgium, 6-8 July, 2011* (pp. 41-46).
- Meunier, A., Schmit, J. F., Stas, A., Kutluk, N., & 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2356-2360.
- Morris, J., Clover, G. R. G., Harju, V. A., Hugo, S. A., & Henry, C. M. (2001). Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for *Beet necrotic yellow vein virus* detection. *Journal of Virological Methods*, 95(1-2), 163-169.
- Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I., & Boonham, N. (2000). Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 90(5), 448-453.

- Nielsen, S. L., Nicolaisen, M., Scheel, C., & Dinesen, I. G. (2001). First record of *Beet necrotic yellow vein virus* in Denmark. *Plant Disease*, 85(5), 559-559.
- Norouzi, P., Sabzehzari, M., & Zeinali, H. (2015). Efficiency of some molecular markers linked to rhizomania resistance gene (*Rz1*) for marker assisted selection in sugar beet. *Journal of crop science and biotechnology*, 18(5), 319-323.
- Payne, P. A., & Asher, M. J. C. (1990). The incidence of *Polymyxa betae* and other fungal root parasites of sugar-beet in Britain. *Plant Pathology*, 39(3), 443-451.
- Peltier, C., Hleibieh, K., Thiel, H., Klein, E., Bragard, C. & Gilmer, D. (2008). Molecular biology of the *Beet necrotic yellow vein virus*. *Plant Viruses*, 2, 14–24.
- Ratti, C., Clover, G. R., Autonell, C. R., Harju, V. A., & 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(1-2), 41-47.
- Rush, C. M. (2003). Ecology and epidemiology of benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 567-592.
- Samiei, A., & Mehrvar, M. (2018). Genetic diversity and distribution of *Beet black scorch virus* in Iran. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, 31(3), 540-547.
- Shen, R., & 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), 448-458.
- Sohi, H., & Maleki, M. (2004). Evidence for presence of types A and B of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Iran. *Virus Genes*, 29(3), 353-358.
- Soltani, I. J., Mehrvar, M., Zakiaghl, M., Mahmoudi, S. B., & Salati, M. (2019). Detection of *Beet black scorch virus* and other Associated Soil-borne Viruses and determining some of their Molecular Aspects. *Journal Of Plant Protection. Vol. 33*(3), 245-258.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., & Lemaire, O. (2005). Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *Journal of General Virology*, 86(10), 2897-2911.
- Tamada, T. 1975. Descriptions of plant viruses. No. 144. CMI/AAB. 4 pp.
- Tamada, T., and Kondo, H. (2013). Biological and genetic diversity of plasmodiophorid-transmitted viruses and their vectors. *J. Gen. Plant Pathol.* 79, 307–320.
- Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T., & Saito, M. (1999). RNA3 deletion mutants of *Beet necrotic yellow vein virus* do not cause rhizomania disease in sugar beets. *Phytopathology*, 89(11), 1000-1006.
- Viswanathan, R., Balamuralikrishnan, M., & Karuppaiah, R. (2008). Duplex-reverse transcription-polymerase chain reaction (D-RT-PCR)-a technique for the simultaneous detection of viruses causing sugarcane mosaic. *Sugar Tech*, 10(1), 81-86.

Watpade, S., Raigond, B., Pramanick, K. K., Sharma, N., Handa, A., & Sharma, U. (2013). Simultaneous detection of *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* and *Apple mosaic virus* in crab apples and apple rootstocks by duplex RT-PCR. *Scientia Horticulturae*, 164, 88-93.

Weiland, J. J., Larson, R. L., Freeman, T. P., & Edwards, M. C. (2006). First report of *Beet black scorch virus* in the United States. *Plant Disease*, 90(6), 828-828.

Weiland, J. J., Van Winkle, D., Edwards, M. C., Larson, R. L., Shelver, W. L., Freeman, T. P., & Liu, H. Y. (2007). Characterization of a US isolate of *Beet black scorch virus*. *Phytopathology*, 97(10), 1245-1254.

Yilmaz, N. D. K. (2016). Identification of strain types of some *Beet necrotic yellow vein virus* isolates determined in Northern and Central Parts of Turkey. *Eurasian Journal of Soil Science*, 5(3), 241-248.



© 2023 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and *Beet black scorch virus* (BBSV) using Duplex Reverse Transcription-PCR method

J. Soltani Idliki ^{1*}, M. Mehrvar ²

1. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Sugar Beet Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran (soltani_jam@yahoo.com)
2. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 18 April 2022

Accepted: 23 January 2023

Abstract

Background and Objectives

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) and *Beet black scorch virus* (BBSV) have been observed in infected sugar beet roots from Iranian fields. This study aimed to detect the two viruses simultaneously to save time and energy during the infection detection process.

Materials and Methods

Three methods were utilized in this study. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect two viruses following total RNA extraction from the farm sample. In the first method (the standard method), the mentioned viruses were identified by amplifying 545 bp fragments from the TGB region of the RNA2 genome of the BNYVV virus and 305 bp fragments from the 3'UTR region of the BBSV virus using specific primers. Viruses on an infected root were identified using RT-PCR with primers specific to each virus and performed independently. In the second and third methods, we employed simplex and duplex RT-PCR gradient methods to simultaneously identify two viruses at annealing temperatures of 52, 54, and 56 °C. To this end, virus-specific primers (designed from a part of the gene encoding the coat protein) were used separately but simultaneously with a common PCR program in a thermocycler. These specific primers amplified 391 and 453 bp fragments of the BNYVV and BBSV coat proteins, respectively.

Results

The study's findings show that by performing simplex and duplex RT-PCR simultaneously and optimizing the annealing temperature of primers from the gene encoding the protein coat, target fragments of 453 and 391 bp from BBSV and BNYVV, respectively, are amplified. This study found that an annealing temperature of 56 °C is the optimal temperature for duplex RT-PCR to separate the two viruses. Consequently, simultaneous identification of the BNYVV and BBSV was achieved through this method.

Discussion

The present study demonstrates that simplex and duplex RT-PCR are suitable for simultaneous detection and are cost-effective in terms of saving time and energy. They can

also be used to prepare distribution maps in sugar beet cultivation areas and to evaluate and identify resistant sugar beet lines in breeding programs under greenhouse conditions.

Keywords: *Primer, Rhizomania, Beet black scorch virus, sugar beet, RT-PCR*

Associate editor: R. Almasi (Ph.D.)

Citation: Soltani Idliki, J. & Mehrvar, M. (2023). Simultaneous detection of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) and *Beet black scorch virus* (BBSV) using Duplex Reverse Transcription-PCR method. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(1), 9-23. <https://doi.org/10.22055/ppr.2023.18033>.