

## تأثیر قارچ میکوریز *Rhizoglosum irregular* در آلودگی گوجه فرنگی با ویروس کوتولگی بوته انبوهی گوجه فرنگی

ندا خوش خطی، امید عینی<sup>✉</sup>، داود کولیوندگروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران. <sup>✉</sup>omid.eini@znu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۶ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۰۵ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۰

### چکیده

ویروس کوتولگی بوته‌انبوهی گوجه‌فرنگی (*Tomato bushy stunt virus* - TBSV) از ویروس‌های مهم گوجه فرنگی در مزارع ایران و سراسر جهان است. در این پژوهش اثر میکوریزا در آلودگی ویروس کوتولگی بوته انبوهی در گوجه فرنگی بررسی شد. به این منظور، مایه تلقیح میکوریزا در زمان نشاکاری گوجه‌فرنگی در بستر کشت گیاه اضافه گردید و بعد از چهار هفته، TBSV بصورت مکانیکی به گیاهان مایه‌زنی شد. میزان تکثیر ویروس در فاصله‌های زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز بعد از مایه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارها شامل گیاهان شاهد (C)، گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان میکوریزایی (M) و گیاهان میکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV) بودند. نتایج بررسی میزان غلظت نسبی ویروس توسط روش Real-time PCR در گیاهان، بیانگر کاهش معنی‌دار آن در گیاهان MV در مقایسه با گیاهان V بود و این کاهش در بازه‌های زمانی بعدی بررسی بیماری مشخص‌تر بود. بررسی میزان ژن‌های *AGO2* (*Argonaute*) و *MYB33* (*Myeloblastosis*) نیز مشخص نمود که این ژن‌ها در گیاهان MV نسبت به گیاهان V افزایش معنی‌دار داشته‌اند. این افزایش نشان‌دهنده افزایش مقاومت گیاهان MV نسبت به گیاهان V بوده و همین‌طور تأییدکننده تکثیر کمتر ویروس در گیاهان گوجه‌فرنگی تلقیح شده با میکوریزا می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از قارچ میکوریز به عنوان تحریک کننده سیستم دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی ممکن است روش خوبی برای دفاع در برابر این بیماری ویروسی باشد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، پی سی آر، میکوریزا، ویروس کوتولگی بوته انبوهی گوجه‌فرنگی، همزیستی

## Effect of mycorrhizal fungus *Rhizoglosum irregulare* on the infection of tomato with *Tomato bushy stunt virus*

Neda Khoshkhatti, Omid Eini<sup>✉</sup>, Davoud KoolivandDepartment of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. <sup>✉</sup>omid.eini@znu.ac.ir

Received: 17 July 2022 Revised: 27 August 2022 Accepted: 1 September 2022

### Abstract

*Tomato bushy stunt virus* (TBSV) is one of the important tomato viruses in Iran and all over the world. In this study, the effect of mycorrhizae in *Tomato bushy stunt virus* infection was investigated. For this purpose inoculum of mycorrhizal fungus *Rhizoglosum irregulare* was added to the plant growing medium at the time of tomato transplanting and after four weeks, TBSV was inoculated mechanically to the plants. The rate of virus multiplication was evaluated by Real-time PCR at time intervals of 19, 25 and 31 days after inoculation. The treatments included control plants (C), plants infected with TBSV (V), mycorrhizal plants (M) and mycorrhizal plants infected with TBSV (MV). The results of investigating the amount of virus accumulation in plants showed its decrease in MV plants compared to V plants, and this decrease was more obvious in more advanced stages of the disease. Investigating the expression level of *AGO2* and *MYB33* genes also revealed that these genes had a significant increase in MV plants compared to V plants. This increase indicates an increase in the resistance of MV plants to the virus compared to V plants and it also confirms the lower reproduction of the virus in tomato plants inoculated with mycorrhiza. The results of this research show that the use of mycorrhizal fungi as a stimulant of the plant's defense system may be a good way to defend against this viral disease.

**Keywords:** Gene expression, Mycorrhiza, Real-time PCR, Symbiosis, *Tomato bushy stunt virus*

### How to cite:

Khoshkhatti N, Eini O, Koolivand D, 2023. Study of the effect of mycorrhizae on the infection of tomato with *Tomato bushy stunt virus*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 12 (2): 199-209

## مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* L. یکی از مهم‌ترین سبزیجات میوه‌ای در جهان است. این محصول توسط عوامل بیماری‌زای مختلف ویروسی آلوده می‌شود. این آلودگی‌ها باعث کاهش عملکرد گوجه‌فرنگی می‌شوند (Gerik et al. 1990). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی در این گیاه، ویروس کوتولگی بوته‌انبوهی گوجه‌فرنگی (TBSV - *Tomato bushy stunt virus*) است که متعلق به جنس *Tombusvirus* و خانواده *Tombusviridae* است (Nawaz et al. 2014). این بیماری ویروسی برای اولین بار در استان خراسان شمالی از مزارع گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Jafarpour et al. 2010). علائم این ویروس بستگی به میزان آن دارد. عفونت‌های موضعی می‌توانند باعث ایجاد لکه‌های کلروتیک شوند. عفونت‌های سیستمیک نیز می‌توانند باعث ایجاد کوتولگی، تشکیل میوه‌های تغییر شکل یافته و برگ‌های آسیب‌دیده شوند (Yamamura et al. 2005). ابزارآلات کشاورزی، خاک، آب آبیاری و بذر آلوده از راه‌های انتقال ویروس است (Nawaz et al. 2014).

گیاه گوجه‌فرنگی علاوه بر آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا، می‌تواند تعاملات همزیستی با قارچ‌های مایکوریزا آربوسکولار (AMF) ایجاد کند (Miozzi et al. 2011). این رابطه همزیستی بین ریشه‌های گیاه و مایکوریزا آربوسکولار (AM)، آنها را قادر می‌سازد تا رشد خود را بهبود ببخشند (Hildebrandt et al. 2010; Pozo et al. 2007; Timonen et al. 2001). برای اولین بار میکروتوبول‌های قارچی *Rhizoglyphus irregularis* (که قبلاً به عنوان *Glomus intraradices* شناخته می‌شدند) را در همزیستی با گوجه‌فرنگی ثبت کردند. *R. irregularis* یک قارچ مایکوریزا است که قادر به کلونیزه کردن گیاهان با استفاده از اسپور یا هیف خود می‌باشد (Sieverding et al. 2014). همزیستی قارچ مایکوریزا در تعاملات گیاه بیمارگر و تحمل تنش‌های زنده و غیرزنده نقش مهمی ایفا می‌کند. مطالعات متعددی در رابطه با تاثیر همزیستی قارچ مایکوریز بر کاهش بیمارگرهای ویروسی در گیاه انجام شده است. Miozzi et al. (2011) با بررسی تعامل بین ویروس پژمردگی گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*) و قارچ مایکوریز (*Funneliformis mosseae* Tul.) (syn. *Glomus mosseae*) دریافته‌اند که میزان بیان ژن‌های مرتبط دفاعی در گیاه در گیاهان گوجه‌فرنگی مایکوریزی کاهش می‌یابد و در نتیجه مقدار ویروس بالاتری در این گیاهان مشاهده می‌شود. در حالیکه در

گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی ساردینیا (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* - TYLCSV) کاهش میزان ویروس گزارش شده است (Maffei et al. 2014).

قارچ‌های مایکوریز علاوه بر بهبود تغذیه گیاه، واکنش‌های دفاعی گیاه را فعال می‌کند. همزیستی ریشه گیاه با مایکوریزا، می‌تواند بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت را در میزان افزایش دهد (Maffei et al. 2014). از جمله ژن‌هایی که میزان بیان آنها در همزیستی با قارچ مایکوریزا تحت تاثیر قرار می‌گیرد شبه‌گیرنده‌های پروتئین کیناز (Receptor-like protein kinase) هستند که معمولاً در فرایند دفاع گیاه و در پاسخ به چالش‌های خارجی نقش دارند (Miozzi et al. 2011).

به منظور درک چگونگی تقویت سیستم دفاعی گیاهان مایکوریز شده در برابر آلودگی‌های ویروسی، بررسی بیان ژن‌هایی که متاثر از آلودگی‌های ویروسی هستند ضروری است. ژن‌های *MYB33* و *AGO2* هر دو به نوعی در مقاومت گیاه علیه ویروس نقش دارند (Wang et al. 2014; Xia et al. 2016). گروه ژن‌های *MYB* در مسیرهای بیوسنتزی ثانویه، کنترل مرفولوژی سلول، پاسخ‌های هورمونی، دخالت در بیماری‌ها یا مقاومت به آن‌ها دخالت دارند (Du et al. 2009). در پژوهشی ۱۲۷ ژن *MYB* در گوجه‌فرنگی شناسایی شده است (Zhenjun et al. 2016). پروتئین‌های *MYB* نقش بسیار مهمی در پاسخ به استرس‌های بیرونی در گوجه‌فرنگی ایفاء میکنند. حمله عوامل بیماری‌زا می‌تواند موجب تنش در گوجه‌فرنگی شود. در این شرایط فاکتورهای رونویسی *MYB* در مسیر وابسته به اسیدآبسیزیک از سیگنالینگ تنش‌ها، در تنظیم ژن‌های واکنش‌دهنده به تنش نقش دارند (Li et al. 2015). این فاکتورها در انتقال پیام‌های دفاع در برابر پاتوژن‌ها ایفا نقش می‌کنند و این کار را با سرکوب بیان یا خاموشی یک ژن انجام می‌دهند (Lorenzo et al. 2003). در مطالعه‌ای مشخص شده است که میزان بیان *MYB33* پس از آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی به ویروس *Tomato leaf curl New Delhi Virus* (ToLCNDV) به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است (Naqvi et al. 2010).

تعدادی از پروتئین‌های *AGO* نیز در دفاع ضد پاتوژن‌ها نقش دارند. برخی از این پروتئین‌ها با سایر فاکتورهای رونویسی در تعامل هستند. به دلیل این که اولین *AGO* شناخته شده برش RNA هدف را کاتالیز می‌کرد، به عنوان پروتئین‌های برش‌دهنده شناخته شده‌اند (Song et al. 2004). کمپلکس‌های خاموشی

از رسیدن به مرحله سه تا چهار برگی و مشاهده استقرار مایکوریزا در ریشه گیاهان کنترل توسط میکروسکوپ، بصورت مکانیکی توسط ایجاد زخم با پودر کارباندوم با ویروس مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی ویروس از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (H7.4) استفاده شد. ویروس TBSV به صورت نمونه برگی خشک از موسسه Agri-Food and Agriculture Canada تهیه شد.

#### ردیابی ویروس و تعیین کمیت نسبی آن

RNA کل از گیاهان M، V، MV و C در نقطه‌های زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی (days post -dpi) (inoculation) با استفاده از دستورالعمل کیت RNeasy Mini (شرکت کیاژن، آلمان) استخراج شدند. تقریباً ۱۰۰ میلی گرم از بافت‌های برگ در نیتروژن مایع به خوبی سابیده شده و برای استخراج RNA کل استفاده شدند. از محصول DNase I (شرکت آمبیون، آمریکا) برای حذف آلودگی‌های DNA، طبق دستورالعمل‌های سازنده استفاده شد. از RNA خالص شده برای سنتز cDNA توسط آنزیم iScript cDNA (شرکت کیاژن، آلمان) استفاده شد. جفت آغازگر اختصاصی (جدول ۲)، برای شناسایی و تعیین مقدار تجمع ویروس در نمونه‌های آزمایش استفاده شد. برای هر آزمایش، دو میکرولیتر cDNA الگو در واکنشی شامل ۱۰ میکرولیتر از بافر سوپرمیکس SsoFastGreen و ۰/۶ میکرولیتر از آغازگرهای TBSV-Gral-R و TBSV-Gral-F استفاده شد. برنامه PCR شامل: ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه (واشرت‌سازی اولیه Initial denaturation)، به دنبال آن ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه (واشرت‌سازی Denaturing)، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال) و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه (بسط و گسترش Extension) و در نهایت چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه (بسط نهایی Final Extension) بود. سطح بیان RNA ویروس با ترسیم یک منحنی استاندارد و رقیق‌سازی‌های سری از cDNAهای مخلوط شده اندازه‌گیری شد و برای هر نمونه نسبت به ژن مرجع *UBI3* (Accession No. X58253)، نرمال شد. برای محاسبه تجمع نسبی ویروس برای هر نمونه، از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده شد. سه گیاه از هر تیمار که شامل هشت تکرار بود به صورت تصادفی انتخاب شد و از هر تکرار نیز، سه تکرار تکنیکال در آزمون ریل‌تایم در نظر گرفته شد. آنالیز آماری در سه زمان با استفاده از آزمون اندازه‌گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

ژن در سطح رونویسی شامل *AGO4* و *AGO6*، *AGO9* هستند (Havecker et al. 2010). کمپلکس‌های خاموشی ژن در سطح پس از رونویسی نیز شامل *AGO1*، *AGO2* و *AGO7* می‌باشند (Montgomery et al. 2008). *AGO2* از جمله پروتئین‌های آرگونات است که در مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی علیه برخی از ویروس‌ها نقش دارد (Xia et al. 2016). به عنوان مثال این پروتئین نقش مهمی در خاموش کردن RNA ویروس X سیب‌زمینی در گوجه‌فرنگی دارد (Kwon et al. 2020). همچنین فعالیت *AGO2* در ایجاد مقاومت به ویروس TBSV در گیاه *Nicotiana benthamiana* گزارش شده است (Scholthof et al. 2011).

با توجه به اهمیت بسیار زیاد گوجه‌فرنگی در سبب غذایی مردم و کشت وسیع آن در سطح کشور، درک ماهیت کنترلی قارچ‌های مایکوریز در برابر این ویروس می‌تواند در ارائه راهکارهای مدیریتی مناسب راهگشا باشد. بنابراین هدف از این تحقیق، بررسی اثر مایکوریز روی آلودگی ویروس کوتولگی بوته انبوهی در گوجه فرنگی می‌باشد تا بتوان با درک ارتباط بین آن و میزان بروز این بیماری در گیاهان مایکوریزی، برآورد بهتری از عکس العمل میزبان به بیماری مذکور در مدیریت بیماری بدست آورد.

#### مواد و روش‌ها

##### طراحی تجربی و مواد زیستی

بذرهای گوجه‌فرنگی (رقم بوش بیف استیک (Extension))، شرکت براندون آمریکا) در سینی‌های جوانه زنی قرار گرفتند. نشاها پس از چهار هفته به گلدان‌های یک لیتری شامل ورمیکولیت و ماسه (۱:۱) منتقل شدند. جهت اجرای طرح کاملاً تصادفی، چهار تیمار: گیاهان شاهد (C)، گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان مایکوریزی *R. irregularis* (M) و گیاهان مایکوریزی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV) شامل ۸ گیاه در سه تکرار برای هر تیمار آزمایش شدند. در هنگام انتقال نشاها به گلدان‌ها، ۱۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون قارچ مایکوریز *R. irregularis* شامل ۱۲۰۰۰ اسپور زنده در هر گرم پودر (تهیه شده از کمپانی Premier Tech Bio- technologies، کانادا) در یک لیتر آب، در نزدیکی ریشه‌ها اسپری شدند تا برای تلقیح تیمارهای MV و M استفاده شوند. گیاهان در یک گلخانه (۱۴ ساعت در نور/ ۱۰ ساعت در تاریکی) در دمای  $24 \pm 3$  درجه سلسیوس نگهداری شدند. گیاهان V و MV در شرایط رشدی و محیطی یکسان پس

مجموع امتیاز عددی / (تعداد گیاهان آلوده مشاهده شده × حداکثر درجه بیماری) × ۱۰۰.

$$PDS = 100 \left[ \frac{0a + 1b + 2c + 3d + 4e}{4(a + b + c + d + e)} \right]$$

که در آن a، b، c، d و e تعداد گیاهان به‌ازای هر یک از امتیازات می‌باشد.

همچنین بررسی آماری شدت بیماری در تیمارها توسط اندازه‌گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی ( $P < 0.001$ ) با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

بررسی واکنش فنوتیپی تیمارها به ویروس و ارزیابی شدت بیماری

علائم در گیاهان مایه‌زنی شده، از هفته سوم بعد از کشت مشاهده گردید. علائم مشاهده شده در سه بازه زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ dpi ارزیابی شده و نمره‌دهی با استفاده از مقیاس ذیل (Friedmann *et al.* 1998) همراه با برخی اصلاحات پیشنهادی انجام شد (جدول ۱).

شاخص شدت بیماری گیاه (PDS) plant disease severity در پاسخ هر تیمار به ویروس‌ها مطابق مقالات قبلی محاسبه شدند (Arunachalam *et al.* 2002). به طور خلاصه،  $PDS =$

جدول ۱. نمره دهی علائم آلودگی به بیماری کوتولگی بوته گوجه‌فرنگی.

Table 1. Grading of tomato bushy stunt virus symptoms.

Symptoms	Grade
No symptoms	0
Leaf mild mosaic	1
Leaf mosaic and Cupped leaf	2
Yellowing and Cupped leaf	3
Yellowing, Cupped leaf and Stunted plants	4

al. 2000)

بیان ژن‌های هدف میکروآران‌ای‌ها با ترسیم یک منحنی استاندارد برای هر ژن اندازه‌گیری شد. سطح بیان این ژن‌ها برای هر نمونه نسبت به ژن مرجع Ubiquitin3 (*UBI3*) نرمال شد. محاسبه و آنالیز آماری مقدار نسبی بیان ژن در سه زمان با استفاده از اندازه‌گیری‌های مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی انجام شد.

بررسی بیان ژن‌های *MYB33* و *AGO2*

با استفاده از تکنیک RT-qPCR، میزان بیان ژن‌های *AGO2* و *MYB33* در برگ‌های تیمارهای مختلف در ۱۹، ۲۵ و ۳۱ dpi مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش RT-qPCR با استفاده از cDNA تهیه شده و آغازگرهای اختصاصی آن برای این ژن‌ها انجام شد (جدول ۲). آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های فوق توسط نرم‌افزار پرایمر ۳ (Primer 3) طراحی شدند (Rozen *et al.* ۲۰۰۲).

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق.

Table 2. Specifications of primers used in this research.

Gene	Primer Sequence (5' to 3')	Reference
TBSV-GRAL	F: 5' TTTGGTAGGTTGTGGAGTGC 3' R: 5' AAGGGTAAGGATGGTGAGGA 3'	Harris <i>et al.</i> , 2006
MYB33	F: 5' CCTCTTCTTCAGAGCCCTCAT 3' R: 5' CAAGAGAAGGAAGAGGGGAAG 3'	In this research
AGO2	F: 5' CTCCTTCACCATTCACACAC 3' R: 5' CCCCCAAAGCAGATAAAACA 3'	In this research
UBI3	F: 5' TCCATCTCGTGCTCCGTCT 3' R: 5' GAACCTTCCAGTGCATCAACC 3'	Song <i>et al.</i> , 2015

قسمت‌های روی زمینی گیاهان، هشتاد روز بعد از کاشت

ارزیابی زیست‌توده

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز جهت ردیابی مولکولی TBSV در روز نوزدهم بعد از تلقیح گیاهان با ویروس نشان داد که در گیاهان تیمارهای MV و V قطعه‌ای به اندازه ۵۹۰ جفت باز از ژنوم تکثیر شده است (شکل ۱).

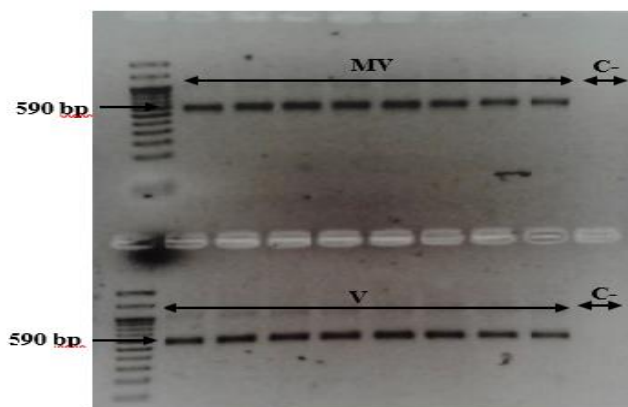
از لحاظ فنوتیپی در بازه‌های زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی گیاهان با ویروس، در گیاهان V علائم شدیدتری به صورت زردی و کوتولگی نسبت به علائم موزائیک در گیاهان MV مشاهده و به شرح جدول ۳ ثبت و امتیازدهی شد. هیچ علائم ظاهری از بیماری در گیاهان گروه کنترل مشاهده نشد (شکل ۲).

نتایج شاخص شدت بیماری (جدول ۴) و بررسی آماری آن نیز نشان داد در گیاهان MV، شدت بیماری در بازه‌های زمانی مختلف به طور معنی‌داری کمتر از گیاهان V بود (شکل ۳).

برای ارزیابی زیست‌توده (بیومس) و اندازه‌گیری وزن تر و خشک برداشت شد و در نهایت داده‌های حاصل از نظر آماری (آزمون آنووا- بونفرونی  $P < 0.05$ ) مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور، اندام‌های گیاهان سه سانتی‌متر از بالای طوقه قطع شدند و بلافاصله توسط ترازو با حساسیت یک صدم گرم وزن شدند. بعد از آن به منظور تعیین وزن خشک، پاکت‌های حاوی گیاهان به مدت سه شبانه روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند تا آب گیاهان به طور کامل تبخیر شود و در پایان با استفاده از ترازوی دیجیتال (دقت ۰/۰۱) وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد.

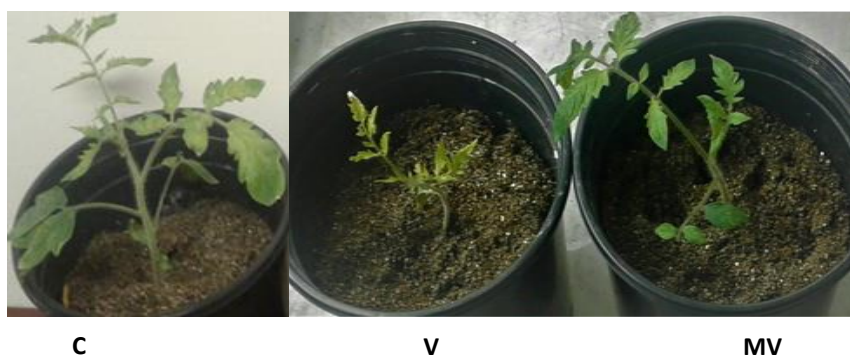
## نتایج

### ردیابی مولکولی ویروس و علائم ظاهری در گیاهان



شکل ۱. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای TBSV در روز ۱۹ پس از مایه‌زنی گیاهان با ویروس. گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان مایکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV) و کنترل منفی (C). از مارکر DNA 100bp استفاده شده است.

**Figure 1.** Electrophoresis of Polymerase chain reaction product with TBSV primers 19 days after inoculation of plants with virus. plants infected with TBSV (V), mycorrhizal plant infected with TBSV (MV) and negative control (C). 100bp DNA ladder was used.



شکل ۲. علائم ظاهری در گیاه آلوده به TBSV (V)، گیاهان مایکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV) و گیاه شاهد (C) در روز ۳۱ پس از مایه‌زنی ویروس.

**Figure 2.** Disease symptoms in plants infected with TBSV (V), mycorrhizal plants infected with TBSV (MV) and control plants (C) on the 31st day after inoculation.

جدول ۳. امتیازدهی علائم ظاهری در گیاهان آلوده به TBSV (V) و گیاهان مایکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV) در بازه‌های زمانی

۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه زنی ویروس (dpi).

**Table 3.** Scoring of disease symptoms in plants infected with TBSV (V) and mycorrhizal plants infected with TBSV (MV) at 19, 25 and 31 days after virus inoculation (dpi).

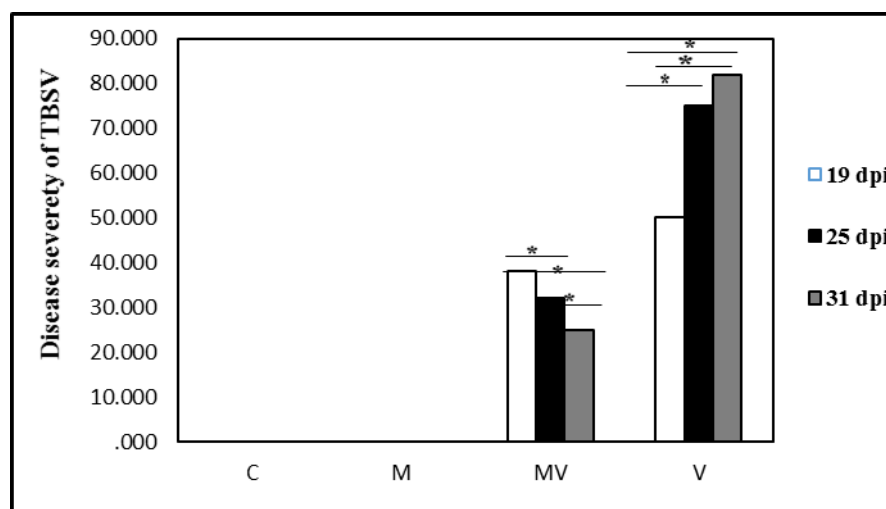
Treatment \ dpi	19	25	31
V	2, 3	2, 3, 4	3, 4
MV	2	2, 1	1

The scoring system of Friedmann *et al.* (1998): score 1 for leaf mild mosaic, score 2 for leaf severe mosaic and cupped leaf, score 3 for Yellowing, Cupped leaf, and score 4 for Yellowing, Cupped leaf and Stunted plants.

**جدول ۴.** میزان شاخص شدت بیماری در تیمارهای MV و V در بازه‌های زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی ویروس (dpi).

**Table 4.** Disease severity index in MV and V treatments at three time points 19, 25 and 31 after inoculation with virus (dpi).

Treatment \ dpi	19	25	31
V	50%	75%	82%
MV	38%	32%	25%



**شکل ۳.** شدت بیماری در گیاهان شاهد (C)، گیاهان مایکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس (MV)، گیاهان آلوده به TBSV (V) و گیاهان مایکوریزایی (M) در ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی ویروس (dpi). تفاوت معنی‌دار بین شدت بیماری تیمارها در سه زمان مختلف توسط ستاره نشان داده شده است (اندازه‌گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی ( $p < 0.001$ )).

**Figure 3.** Disease severity of TBSV in control plants (C), plants infected with TBSV (V), mycorrhizal plants (M) and mycorrhizal plants infected with TBSV (MV) at three stages of infection in 19, 25 and 31 days after inoculation virus (dpi) using RT-qPCR. Significant differences between viral RNA accumulations for each treatment at three different times are indicated by (\*) using repeated-measures ANOVA and Benferroni's post hoc test ( $p < 0.001$ ).

غلظت ویروسی با علائم ظاهری خفیف‌تر در گیاهان مایکوریزایی همراه بود. همچنین میزان تجمع ویروس در گیاهان MV در روز ۲۵ ام کاهش یافت و در روز ۳۱ هم کمترین میزان آن در این گیاهان مشاهده شد.

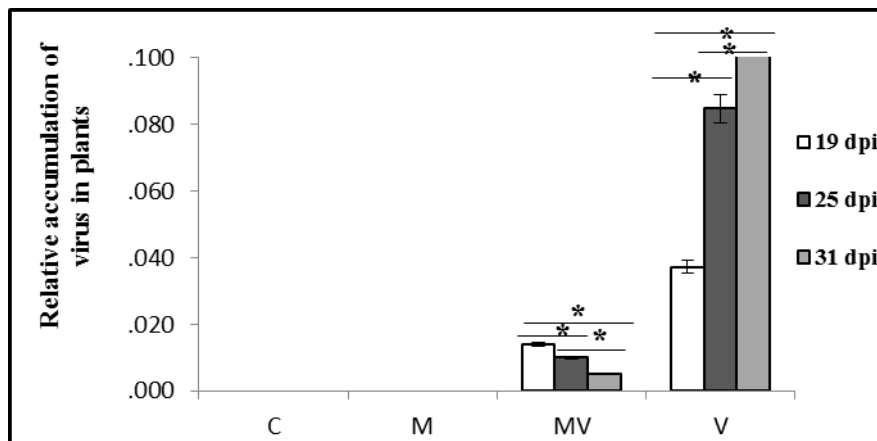
نتایج بررسی آماری داده‌های RT-qPCR نیز نشان داد که در تیمار MV میزان غلظت نسبی ویروس در هر سه بازه زمانی

اثر مایکوریزا بر میزان تجمع ویروس

مقایسه میزان تجمع ویروس در تیمارها با استفاده از RT-qPCR نشان داد که گیاهان MV نسبت به گیاهان V، سطح پایینتری از غلظت ویروس را دارند. میزان تجمع ویروس ۱۹ روز پس از تلقیح در گیاهان مایکوریزایی آلوده به ویروس در مقایسه با گیاهان آلوده به ویروس فاقد مایکوریزا کاهش یافت. این کاهش

شاهد کاهش آن بودیم و نشان داد که همزیستی قارچ میکوریز با *R. irregularis* با گیاه گوجه‌فرنگی در طول زمان باعث کاهش غلظت ویروس TBSV می‌شود ( $p < 0.001$ ) (شکل ۴).

در سطح معنی‌داری کمتر از تیمارهای V بود. همچنین بین میزان تجمع ویروس در تیمارهای V و MV تفاوت معنی‌دار طی زمان مشاهده شد بدین صورت که غلظت ویروس در تیمار V با گذشت زمان به طور معنی‌دار افزایش ولی در تیمار MV



شکل ۴. میزان تجمع نسبی ویروس در گیاهان شاهد (C)، گیاهان میکوریزایی (M)، گیاهان آلوده به TBSV (V) و گیاهان میکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV) در سه مرحله از عفونت: ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی ویروس (dpi) با استفاده از RT-qPCR. تفاوت معنی‌داری بین تجمع RNA ویروسی برای هر تیمار در سه زمان مختلف توسط ستاره نشان داده شده است (اندازه‌گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی ( $p < 0.001$ )).

**Figure 4.** Virus accumulation rate in control plants (C), plants infected with TBSV (V), mycorrhizal plants (M) and mycorrhizal plants infected with TBSV (MV) at three stages of infection in 19, 25 and 31 days after inoculation virus (dpi) using RT-qPCR. Significant differences between viral RNA accumulations for each treatment at three different times are indicated by (\*) using repeated-measures ANOVA and Benferroni's post hoc test ( $p < 0.001$ ).

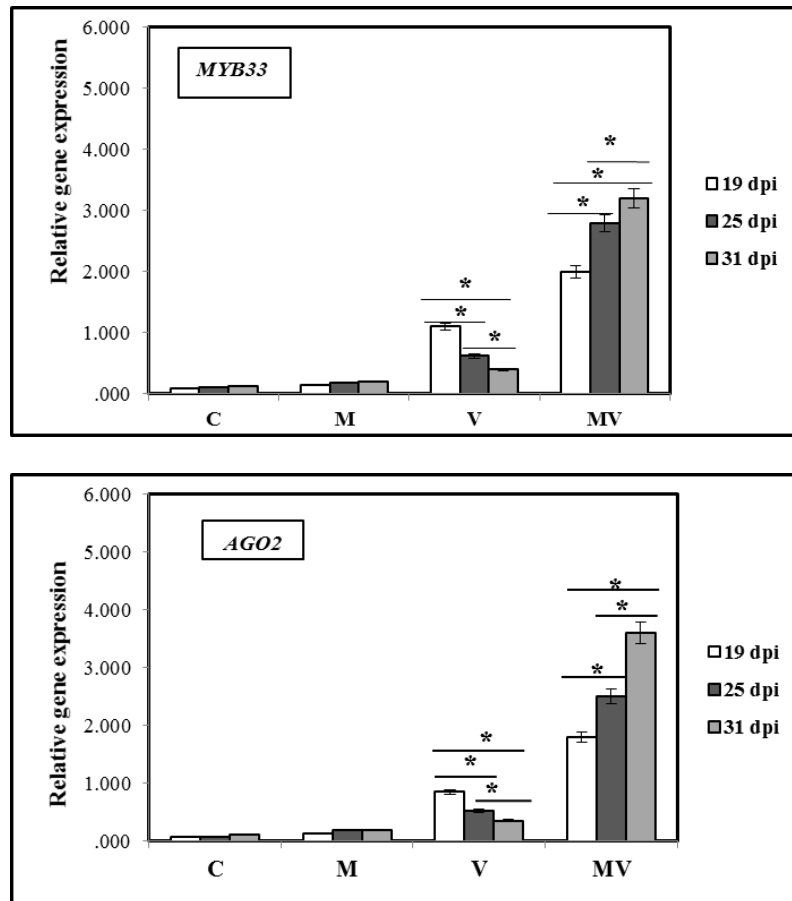
دار ولی در تیمارهای MV شاهد افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های فوق بودیم (شکل ۵).

#### میزان زیست توده

در پایان آزمایش مشخص شد که وزن تر و خشک بخش‌های زمینی در تیمار V نسبت به تیمارهای دیگر به طور معنی‌داری کاهش یافته است و گیاهان در تیمار MV زیست‌توده بیشتری نسبت به تیمار V داشتند (جدول ۵).

میزان بیان ژن‌های *AGO2* و *MYB33* در گیاهان میکوریزایی آلوده به TBSV

نتایج RT-qPCR در زمان‌های ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز بعد از مایه‌زنی گیاه با ویروس، کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن‌های *AGO2* و *MYB33* در گیاهان V نسبت به گیاهان MV را نشان داد. همچنین با گذشت زمان تفاوت معنی‌دار بین میزان بیان ژن‌ها در تیمارهای V و MV مشاهده شد بدین صورت که بیان ژن‌های *AGO2* و *MYB33* در تیمارهای V با گذشت زمان کاهش معنی‌



شکل ۵. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های *MYB33* و *AGO2* با استفاده از RT-qPCR در گیاهان شاهد (C)، گیاهان مایکوریزایی (M)، گیاهان آلوده به TBSV (V) و گیاهان مایکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV) در سه مرحله از عفونت در ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی ویروس (dpi). تفاوت معنی‌داری بین بیان ژن‌ها برای هر تیمار در سه زمان مختلف توسط ستاره نشان داده شده است (اندازه‌گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی (p < 0.001)).

**Figure 5.** Expression analysis of *MYB33* and *AGO2* genes using RT-qPCR in control plants (C), mycorrhizal plants (M), plants infected with TBSV (v) and mycorrhizal plants infected with TBSV (MV) in three stages of infection in 19, 25 and 31 days after virus inoculation (dpi). Significant differences between the expression of genes for each treatment at three different times are indicated by (\*) using repeated measure ANOVA and Benferroni's post hoc test (p < 0.001).

**جدول ۵.** وزن زیست توده در گیاهان شاهد (C)، گیاهان مایکوریزایی (M)، گیاهان آلوده به TBSV (V) و گیاهان مایکوریزایی مایه‌زنی شده با ویروس TBSV (MV). مقادیر هر ستون که روبروی آن حروف مختلف است نشان دهنده تفاوت معنی‌دار وزن تر و خشک بین تیمارها است (اندازه‌گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی (P < 0.05)).

**Table 5.** Biomass weight in control plants (C), mycorrhizal plants (M), TBSV-infected plants (V) and TBSV-infected mycorrhizal plants (MV). Values in each column with different letters in front of them indicate significant differences in fresh and dry weight between treatments according to ANOVA-Bonferroni post hoc-test (p < 0.05).

Treatment	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)
	*M ± SD	M ± SD
V	5.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>
MV	7.4 ± 0.34 <sup>c</sup>	2 ± 0.3 <sup>c</sup>
C	8.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.3 <sup>b</sup>
M	8.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.4 <sup>b</sup>

\*M ± SD = Mean ± Std. Deviation



## بحث

حاکمی از افزایش معنی‌داری بیان آن در تیمار MV نسبت به تیمار V بود. مطالعات مختلف نشان داده است که پروتئین MYB33 به‌طور گسترده در بافت‌های مختلف گیاهان وجود دارد و در رشدونمو گیاه و همینطور مقاومت آن ایفای نقش می‌کند (Li et al. 2016).

این موضوع در مورد ژن *AGO2* هم به همین صورت اتفاق افتاد و نتایج حاکمی از افزایش بیان این ژن در تیمار MV نسبت به تیمار V بود. پروتئین‌های آرگونوات از جمله *AGO2* نیز در پاسخ‌های دفاعی گیاه و مقاومت در برابر ویروس‌های مختلف نقش دارند (Xia et al. 2016). از آنجا که هر دو این ژن‌ها به نوعی در مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی به عوامل ویروسی نقش دارند، افزایش معنی‌داری بیان آن‌ها در گیاهان MV نسبت به گیاهان V این احتمال را می‌دهد که مایکوریزا باعث افزایش مقاومت گیاه به ویروس شده است. همچنین افزایش معنی‌داری بیان این ژن‌ها در تیمار MV در سه بازه زمانی ممکن است به این علت باشد که قارچ مایکوریزا بنا به دلایلی در هنگام حمله ویروس باعث افزایش بیان این دو ژن شده و این افزایش بیان باعث تجزیه بیشتر ویروس و ایجاد مقاومت به آن شده است و چون در آلودگی ویروس در گیاه مایکوریزی، *AGO2* و *MYB33*‌های بیشتری در کار تجزیه ویروس بودند لذا سلول میزان بیشتری از این ژن‌ها تولید کرده تا پروسه‌های طبیعی دیگر در آن بصورت نرمال انجام شوند.

کاهش بیان این ژن‌ها در تیمار V در سه بازه زمانی نیز احتمالاً به دلیل تکثیر و غلبه بیشتر ویروس بر سیستم دفاعی گیاه میزبان است ولیکن مطالعات نشان داده که بیش از یک محرک می‌تواند یک ژن را فعال یا غیرفعال نماید و یا یک محرک خاص می‌تواند اثرات متفاوتی روی ژن‌های مختلف داشته باشد (Nath et al. 2006). به‌عنوان مثال بیان ژن‌ها می‌تواند توسط میکروآر‌ان‌ای‌ها مورد هدف قرار گرفته و تنظیم گردد (Naqvi et al. 2010). بنابراین آنچه مشخص است این است که کاهش معنی‌داری بیان این ژن‌ها در تیمار ویروس نیازمند تحقیقات بیشتر است.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از قارچ‌های مایکوریز به عنوان تحریک‌کننده سیستم دفاعی ممکن است روش خوبی برای دفاع گیاه در برابر بیماری ویروسی کوتولگی بوته انبوهی در گوجه‌فرنگی باشد و شاید در آینده بتوانیم آن‌ها را به عنوان راهکاری برای مدیریت این بیماری در کشاورزی معرفی نماییم. علاوه بر این می‌تواند اطلاعات پایه‌ای جهت انتخاب و کاربرد صحیح ژن‌های مقاومت در تولید گیاهان

به طور کلی قارچ‌های مایکوریز تحمل گیاهان را در برابر تنش‌های زیستی و بیماری‌های مختلف بهبود می‌بخشند (Gernns et al. 2001; Hildebrandt et al. 2007; Pozo & Azcón-Aguilar 2007; Pozo et al. 2010). ولی گزارش‌های کمی درباره تأثیر همزیستی قارچ‌های مایکوریز بر بیماری‌های ویروسی در گیاهان وجود دارد. در تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر مایکوریزا بر میزان آلودگی کوتولگی بوته انبوهی در گیاهان گوجه‌فرنگی همزیست با این قارچ، به بررسی تغییرات بیان ژن *MYB33* و *AGO2* در این گیاهان پرداخته شد. در روزهای بعد از مایه‌زنی ویروس، علائم شدیدتری در گیاهان V در مقایسه با گیاهان MV، مشاهده شد. این نشان می‌دهد گیاهان گوجه‌فرنگی مایکوریزی شده، در برابر عفونت TBSV مقاوم‌تر شدند. مقایسه زیست توده گیاهان بین تیمارهای MV و V نیز نشان داد که زیست‌توده تیمار MV نسبت به V بطور معنی‌داری بیشتر است. علاوه بر این، نتایج RT-qPCR در طی فاصله‌های زمانی مختلف، سطح بالاتری از غلظت TBSV در گیاهان V در مقایسه با گیاهان MV نشان داد. بنابراین همزیستی قارچ مایکوریز *R. irregulare* با گوجه‌فرنگی، غلظت ویروس در گیاه را کاهش می‌دهد. به طور مشابه، در تحقیقی نشان دادند که در گیاهان گوجه‌فرنگی کلنیزه شده با *F. mosseae* تجمع TYLCSV کاهش می‌یابد (Maffei et al. 2014). همچنین Aseel et al. (2019) در آزمایش گلخانه‌ای نشان دادند که مایکوریزی کردن، گیاهان را در برابر ویروس موزائیک گوجه‌فرنگی محافظت می‌کند و منجر به کاهش قابل‌توجهی در سطح تجمع ویروس می‌شود. با این وجود غلظت بالاتری از ویروس پزمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی در گیاهان همزیست با قارچ *Serendipita indica* (syn: *Piriformospora indica*) وجود دارد (Miozzi et al. 2011). همین طور در تحقیقات دیگری مشخص شد که سطح بالاتری از تجمع ویروس در گوجه‌فرنگی مایکوریز شده آلوده به *Pepino mosaic virus* وجود دارد (Fakhro et al. 2010). این ممکن است نشان دهد که اثر مایکوریز کردن گیاه در کنترل ویروس بستگی به تعامل خاص گیاه میزبان، ویروس و قارچ مایکوریز دارد. رابطه بین ویروس، گیاه و قارچ مایکوریز یک سیستم چند وجهی است و عوامل مختلفی مانند نوع و شیوه زندگی بیمارگر ویروسی، وضعیت رشدی گیاه و زمان تعامل، آن را به سمت نتیجه منفی یا مثبت سوق می‌دهد (Miozzi et al. 2011).

نتایج RT-qPCR برای ژن *MYB33* نیز در زمان‌های مختلف

### سپاسگزاری

از دانشگاه زنجان جهت حمایت از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

مایکوریزمقاوم به بیماری‌های ویروسی فراهم نماید. انجام آزمایشات گسترده جهت ارزیابی مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی همزیست با مایکوریزا به این ویروس‌ها در شرایط مزرعه و تحت عملیات کشاورزی ضروری می‌باشد.

### References

- Arunachalam P, Radhakrishnan V, Mathew SK, Kumar PS, 2002. Reaction of bitter melon genotypes against distortion mosaic virus. *International Journal of Vegetable Science* 29: 55–57.
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang XF, Yang WJ *et al.*, 2009. Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. *Biochemistry* 74: 1–11.
- Fakhro A, Andrade-Linares DR, Von BS, Bandte M, Büttner C, *et al.*, 2010. Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. *Mycorrhiza* 20: 191–200.
- Friedmann M, Lapidot M, Cohen S, Pilowsky M, 1998. A novel source of resistance to tomato yellow leaf curl virus exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 1004–1007.
- Gerik JS, Duffus JE, Perry R, Stenger DC, Van Maren, AF, 1990. Etiology of tomato plant decline in California desert. *Phytopathology* 80: 1352–1356.
- Gernns H, Alten H, Poehling HM, 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen—is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11: 237–243.
- Harris R, Ochoa-Corona R, Lebas B, Timudo O, Stewart F, Alexander B, 2006. Broad detection and diagnosis of viruses of the genus Tombusvirus by RT-PCR coupled to single strand conformation polymorphism analysis. In Proceedings of the 7th Australasian Plant Virology Workshop, November 8–11, Rottneest Island, Perth, Australia. p. 48.
- Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush M, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC, 2010. The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22: 321–334.
- Hildebrandt U, Regvar M, Bothe H, 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139–146.
- Jafarpour B, Sabokkhiz MA, 2010. Survey of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and Tomato bushy stunt virus (TBSV) in Razavi Korasan province. *Petria* 20: 148–153.
- Kwon J, Kasai A, Maoka T, 2020. RNA silencing-related genes contribute to tolerance of infection with potato virus X and Y in a susceptible tomato plant. *Virology journal* 17: 149.
- Li C, Ng CKY, Fan LM, 2015. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany* 114: 80–91.
- Li Z, Peng R, Tian Y, Han H, Xu J, Yao Q, 2016. Genome-Wide Identification and Analysis of the MYB Transcription Factor Superfamily in *Solanum lycopersicum*. *Plant Cell Physiology* 57(8):1657–77.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I, Lopez-Meyer M, Cheung F, Town CD, Harrison MJ, 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The Plant Journal* 50: 529–544.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25: 402–408.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R, 2003. ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165–178.
- Maffei G, Miozzi L, Fiorilli V, Novero M, Lanfranco L, Accotto GP, 2014. The arbuscular mycorrhizal symbiosis attenuates symptom severity and reduces virus concentration in tomato infected by Tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV). *Mycorrhiza* 24: 179–186.
- Miozzi L, Catoni M, Fiorilli V, Mullineaux PM, Accotto GP, Lanfranco L, 2011. Arbuscular mycorrhizal symbiosis limits foliar transcriptional responses to viral infection and favors long-term virus

- accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1562–1572.
- Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li D, Hansen JE, *et al.*, (2008). Specificity of Argonaute 7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133: 128–141.
- Naqvi AR, Haq QM, Mukherjee SK, 2010. MicroRNA profiling of tomato leaf curl new delhi virus (tolcndv) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virology Journal* 7: 281.
- Nath P, Sane VA, Sane AP, Trivedi PK, 2006. Plant gene expression, regulation of. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*. doi: 10.1002/3527600906.mcb.200400154.
- Nawaz H, Umer M, Bano S, Usmani A, Naseer, M, 2014. Research review on tomato bushy stunt virus disease complex. *Journal of Natural Sciences Research* 4: 18–23.
- Pozo M J, Azcón-Aguilar C, 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 393–398.
- Pozo MJ, Jung SC, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C, 2010. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms. *Arbuscular Mycorrhizas Physiology and Function* pp. 193–207.
- Rozen S, Skaletsky H, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365–386.
- Scholthof, KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12: 938–954.
- Shaul O, Galili S, Volpin H, Ginzberg I, Elad Y, *et al.*, 1999. Mycorrhiza- induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 1000–1007.
- Sieverding E, Silva G, Berndt R, Oehl F, 2014. *Rhizoglosum*, a new genus of the Glomeraceae. *Mycotaxon* 129: 373–386.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua L, 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305:1434–1437.
- Timonen S, Smith SA, Smith SE, 2001. Microtubules of the mycorrhizal fungus *Glomus* intraradices in symbiosis with tomato roots. *Canadian Journal of Botany* 79: 307–313.
- Wang, J, Sun N, Deng T, Zhang L, Zuo K, 2014. Genome-wide cloning, identification, classification and functional analysis of cotton heat shock transcription factors in cotton (*Gossypium hirsutum*). *BMC Genomics* 15: 961.
- Xia Z, Zhao Z, Chen L, Li M, Zhou, T, *et al.*, 2016. Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. *Scientific Reports* 6: 20520.
- Yamamura Y, Scholthof HB, 2005. Tomato bushy stunt virus: a resilient model system to study virus-plant interactions. *Molecular Plant Pathology* 6: 491–502.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)