

تأثیر همزیستی قارچ میکوریز *Rhizoglossum irregulare* بر کاهش شدت آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی به ویروس کوتولگی بوته با تأکید بر بیان ژن‌های دخیل در متیلاسیون

ندا خوش‌خطی^۱، امید عینی^{۲*}، داود کولیان^۳

۱. دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲. دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۹)

Effect of *Rhizoglossum irregulare* symbiosis on reducing disease severity in tomato plants infected with *Tomato bushy stunt virus* with emphasis on the expression of methylation-related genes

Neda Khoshkhatti¹, Omid Eini^{2*}, Davoud Koolivand³

1. Ph. D. Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
(Received: Jul. 3, 2020 - Accepted: Sep. 19, 2020)

Abstract

Tomato bushy stunt virus (TBSV), a member of the genus *Tombusvirus* is one of the causal agents for curly disease in tomato plants. In this study, the interaction between a mycorrhizal fungus, *Rhizoglossum irregulare*, and TBSV in tomato plants was investigated. In a completely randomized design experiment, tomato seedlings were inoculated with *R. irregulare* and after four weeks they were inoculated with TBSV. Four treatments were included control plants (C), TBSV - infected plants (V), mycorrhizal plants (M), TBSV - infected mycorrhizal plants (MV). Nineteen days after inoculation the infected plants were tested for symptom production and virus accumulation. Results of symptoms evaluation based on the disease severity index showed a lower disease severity in MV plants compared with V plants. Supporting this result, a lower level of virus accumulation was observed in V plants which was more significant at long-term infection. The expression of methylation-related genes including *ADK*, *HEN1* and *MET1* was tested by Real-time PCR. Results showed that the expression of these genes was significantly higher in MV plants as compared with V plants. An increase in the expression of methylation-related genes in MV plants indicates that resistance to the virus is likely to occur through methylation and also supports the lower level of virus accumulation in MV plants.

Keywords: Methylation genes, Tomato, Mycorrhiza, Tomato bushy stunt virus.

چکیده

با توجه به اهمیت اقتصادی ویروس کوتولگی بوته گوجه‌فرنگی (*Tomato bushy stunt virus*-TBSV) در مزارع سراسر جهان، در این پژوهش ارتباط میان قارچ میکوریزایی *Rhizoglossum irregulare* و ویروس کوتولگی بوته گیاه گوجه‌فرنگی بررسی گردید. به این منظور، در زمان نشاکاری گوجه‌فرنگی، مایه تلقیح میکوریزا در بستر کشت گیاه اضافه گردید. پس از چهار هفته TBSV بصورت مکانیکی به تیمارها مایه‌زنی شد و بررسی شدت علائم بیماری و نمونه‌برداری از آن در نقطه‌های زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز بعد از مایه‌زنی انجام گردید. تیمارها شامل گیاهان شاهد (C)، گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان میکوریزایی (M) و گیاهان میکوریزایی آلوده به ویروس TBSV (MV) بودند. نتایج بررسی علائم ویروسی، با استفاده از شاخص شدت بیماری، بیانگر کاهش شدت بیماری در گیاهان MV در مقایسه با گیاهان V بود. در تأیید این نتایج، میزان تکثیر ویروس نیز در گیاهان MV کاهش معنی‌داری نشان داد و این کاهش در مراحل پیشرفته‌تر بیماری مشخص‌تر بود. بررسی بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون شامل *ADK*، *HEN1* و *MET1* توسط تکنیک Real-time PCR نشان داد که این ژن‌ها در گیاهان MV در مقایسه با گیاهان V بصورت معنی‌دار افزایش بیان داشته‌اند. افزایش بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون در گیاهان MV نشان می‌دهد که مقاومت به ویروس احتمالاً از مسیر متیلاسیون اتفاق می‌افتد و علاوه بر این تأیید کننده تکثیر کمتر ویروس در گیاهان گوجه‌فرنگی تلقیح شده با میکوریزا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های متیلاسیون، گوجه‌فرنگی، میکوریزا، ویروس کوتولگی بوته گوجه‌فرنگی.

مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* از خانواده *Solanaceae* از مهم‌ترین گیاهان میوه‌ای در جهان و از گیاهان فصل گرم است. این محصول توسط عوامل بیماری‌زای مختلف ویروسی آلوده می‌شود (Agrios, 2010). آلودگی‌های ویروسی باعث کاهش عملکرد گوجه‌فرنگی در سراسر جهان می‌شوند (Gerik et al., 1990). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی در این گیاه، ویروس کوتولگی بوته گوجه‌فرنگی (Tomato bushy stunt virus- TBSV) است که متعلق به جنس *Tombusvirus* و خانواده *Tombusviridae* است (Nawaz et al., 2014). پیکره این ویروس جورق‌ر و ژنوم آن یک RNA تک‌رشته‌ای است که کدگذاری پروتئین پوششی p41 و پروتئین‌های p19، p22، p33 و p92 را به عهده دارد (Wu et al., 2013). این بیماری ویروسی انواع محصولات زراعی در ایران را آلوده می‌کند و برای اولین بار در استان خراسان شمالی از مزارع گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Jafarpour et al., 2010). TBSV می‌تواند از بذر آلوده یا به طور غیرمستقیم از طریق انتقال مکانیکی توسط ابزارآلات کشاورزی، خاک و آب آبیاری منتقل شود. هنوز ناقل حشره یا قارچی مشخصی برای آن شناسایی نشده است (Nawaz et al., 2014). علائم این ویروس بستگی به میزبان دارد. عفونت‌های موضعی می‌توانند باعث ایجاد لکه‌های کلروتیک شوند. عفونت‌های سیستمیک نیز می‌توانند باعث ایجاد کوتولگی میوه‌های تغییر شکل‌یافته و برگ‌های آسیب‌دیده شوند. ویروس در برخی از میزبان‌ها، به ویژه گیاه توتون *Nicotiana benthamiana* می‌تواند باعث ناباروری سیستمیک کننده شود (Yamamura et al., 2005).

گیاه گوجه‌فرنگی علاوه بر آلودگی توسط عوامل بیماری‌زا، می‌تواند تعاملات همزیستی با قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AMF) ایجاد کند (Miozzi et al., 2011). این رابطه همزیستی بین میکوریزا

آربوسکولار (AM) و ریشه‌های گیاه، غالباً آن‌ها را قادر می‌سازد تا رشد خود را بهبود ببخشند (Hildebrandt et al., 2007; Pozo et al., 2010). Timonen و همکاران (2001) برای اولین بار میکروتوبول‌های قارچی *Rhizoglosum irregulare* (که قبلاً به عنوان *Glomus intraradices* شناخته می‌شدند) را در همزیستی با گوجه‌فرنگی ثبت کردند. R. Irregulare یک قارچ مایکوریزا است که به عنوان ماده ایمن‌سازی‌کننده خاک در کشاورزی و باغداری مورد استفاده قرار می‌گیرد و قادر به کلونیزه کردن گیاهان با استفاده از اسپور یا هیف قارچ است (Sieverding et al., 2014).

همزیستی AM نقش مهمی در تعاملات گیاه بیمارگر و تحمل تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌کند. علاوه بر این، گزارش‌های زیادی از کاهش خسارت‌های گیاهی ناشی از برخی قارچ‌های بیماری‌زای خاک، نماتدها و ویروس‌ها وجود دارد (Whipps, 2004; Liu et al., 2007). سازوکارهای مختلفی وجود دارند که نقش محافظتی قارچ‌های AM را تأیید می‌کنند (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; Wehner et al., 2010; Whipps, 2004). علاوه بر بهبود تغذیه گیاه، قارچ‌های AM واکنش‌های دفاعی گیاه را فعال می‌کند (Maffei et al., 2014). بدین صورت که همزیستی مایکوریزا با ریشه گیاه، می‌تواند موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت در میزبان شود. به‌عنوان مثال شبه‌گیرنده‌های پروتئین کیناز^۱ که معمولاً در دفاع گیاه و در پاسخ به چالش‌های خارجی نقش دارند، از جمله ژن‌هایی هستند که میزان بیان آنها در همزیستی با قارچ مایکوریزا تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Miozzi et al., 2011).

مطالعه تأثیر همزیستی AM بر بیمارگرهای مهاجم به ویژه عوامل ویروسی در گیاه هنوز چالش

1. Receptor-like protein kinase

عنوان مثال، مشخص شده است که همزیستی قارچ مایکوریز *Funneliformis mosseae* با گیاه سوزن چوپان قرمز با نام علمی *Geranium robertianum* تأثیر مثبتی در فرایند متیلاسیون گیاه دارد (Varga & Soulsbury, 2018).

گزارش‌های متعددی مبنی بر ایجاد مقاومت به بیماری TYLCSV عموماً از طریق افزایش متیلاسیون ژنوم ویروس و جلوگیری از تکثیر آن وجود دارد (Barbieri et al., 2010; Raja et al., 2008; Rodriguez-Negrete et al., 2009; Wang et al., 2014). همچنین، افزایش متیلاسیون ژنوم در گیاهان مقاوم به بیماری ویروس موزاییک یونجه (*Alfaalfa mosaic virus-AMV*) گزارش شده است (Martinez-Perez et al., 2017). با توجه به اینکه که تأثیر قارچ‌های همزیست مایکوریزا در کاهش بسیاری از بیمارگرهای ویروسی نامعلوم است مطالعه تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون میتواند رویکرد مفیدی در جهت درک این ارتباط باشد.

با توجه به کشت وسیع گوجه‌فرنگی در سطح کشور و اهمیت بسیار زیاد آن در سبد غذایی مردم، درک ماهیت کنترلی قارچ‌های مایکوریز در برابر این ویروس می‌تواند در ارائه تدابیر مدیریتی مناسب راهگشا باشد. بنابراین، هدف از این تحقیق درک تأثیرات رابطه همزیستی قارچ مایکوریزا با گیاه گوجه‌فرنگی بر روی شدت آلودگی و میزان تکثیر ویروس TBSV است که همراه با آن به بررسی بیان برخی ژن‌های متیلاسیون مرتبط با دفاع در گیاهان مایکوریز آلوده به ویروس پرداخته می‌شود تا شاید با درک ارتباط بین شدت بیماریزایی و میزان بروز ژن‌های مورد مطالعه در گیاهان مایکوریزی در آینده بتوان با دستکاری ژن‌هایی از میزبان که در کنترل بیماری نقش دارند برآورد بهتری از عکس‌العمل میزبان به ویروس مذکور و همچنین مدیریت بیماری به‌دست آورد.

برانگیز است. Shaul و همکاران (1999) نشان دادند که در گیاهان تنباکو مایکوریزی آلوده به ویروس موزاییک توتون، علائم شدیدتری در مقایسه با گیاهان غیرمایکوریزی ظاهر شده است. به همین ترتیب، Miozzi و همکاران (2011) با بررسی تعامل بین ویروس پژمردگی گوجه‌فرنگی *Tomato spotted wilt virus* و قارچ مایکوریز *Funneliformis mosseae* (syn. *Glomus mosseae*) در گیاهان گوجه‌فرنگی مایکوریز شده دریافتند که میزان بیان ژن‌های مرتبط دفاعی در گیاه کاهش می‌یابد و در نتیجه مقدار ویروس بالاتری در گیاهان مایکوریزی مشاهده می‌شود. در حالیکه، در مطالعه دیگری کاهش میزان ویروس و علائم ناشی از آن در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی ساردینیا (*Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*) گزارش شده است (Maffei et al., 2014). حساسیت یا مقاومت گیاهان مایکوریزی در برابر ویروس ممکن است از مسیر متیلاسیون DNA (Wang et al., 2003) یا RNA (Martinez-Perez et al., 2017) و دخالت ژن‌های مسئول متیله شدن در گیاه رخ دهد. ژن‌های *MET1* (Methyltransferase)، *ADK* (Adenosine kinase) و *HEN1* (Hua enhancer 1)، از مهمترین ژن‌های درگیر در فرایند متیلاسیون هستند که هر سه به نوعی در فرایندهای دفاعی گیاه علیه ویروس نقش دارند (Wang et al., 2014). فرایند متیلاسیون یک مکانیسم خاموشی محافظت شده در گیاه است که بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مهم در مسیرهای رشد و نمو گیاه را هدایت می‌کند و یک سازوکار دفاعی در برابر استرس‌های زنده از جمله آلودگی به ویروس‌هاست (Yang et al., 2011). علاوه بر این گاهی همزیستی قارچ مایکوریز با ریشه گیاه باعث تغییر میزان متیلاسیون در گیاه می‌شود. به

مواد و روش‌ها

طراحی تجربی و مواد زیستی

بذرهای گوجه‌فرنگی (رقم بوش بیف استیک، شرکت براندون آمریکا) در سینی‌های جوانه‌زنی شامل ورمیکولیت و ماسه قرار گرفتند. نشاها پس از چهار هفته به گلدان‌های یک لیتری شامل ورمیکولیت و ماسه (۱:۱) منتقل شدند. جهت اجرای طرح در غالب طرح کاملاً تصادفی، چهار تیمار گیاهان شاهد (C)، گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان مایکوریزایی (M) و گیاهان مایکوریزایی آلوده به TBSV (MV) شامل ۸ گیاه در سه تکرار برای هر تیمار آزمایش شدند. سوسپانسیون از قارچ مایکوریز *R. irregulare* شامل ۱۲۰۰۰ اسپور زنده در هر گرم پودر در نزدیکی ریشه‌ها افشانه شدند تا برای تلقیح تیمارهای MV و M استفاده شوند. گیاهان در یک گلخانه (۱۴ ساعت در نور / ۱۰ ساعت در تاریکی) در دمای $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند.

تأیید ویروس و کمیت آن

RNA کل از گیاهان M، V، MV و C در نقطه‌های زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi) با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (شرکت کیاژن، ایران) استخراج شدند. تقریباً ۱۰۰ میلی گرم از بافت‌های برگ در نیتروژن مایع به خوبی ساییده 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 خالص‌شده برای سنتز cDNA توسط آنزیم iScript cDNA (شرکت کیاژن، ایران) استفاده شد. جفت آغازگر ویژه (Harris et al., 2006)، Gral-R1 (5'TTTGGTAGGTTGTGGAGTGC3')

TBSV-

5'AAGGGTAAGGATGGTGAGGA) و TBSV-Gral-F1 (3' برای شناسایی و تعیین مقدار تجمع ویروس در نمونه‌های آزمایش استفاده شد. برای هر آزمایش، ۲ میکرولیتر cDNA الگو در واکنشی شامل ۱۰ میکرولیتر از بافر سوپرمیکس SsoFastGreen و ۰/۶ میکرولیتر از آغازگرهای TBSV-Gral-F و TBSV-Gral-R استفاده شد. برنامه PCR شامل: ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه جهت واسرشت رشته‌های سنتز شده، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه جهت سنتز DNA و در نهایت یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه جهت کامل شدن رشته‌های ناقص به کار برده شد. سطح بیان ژن ویروس با ترسیم یک منحنی استاندارد برای ژن ویروسی و رقیق‌سازی‌های سری از cDNA 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ همانطور که توسط لیواک و اشمیتگن (۲۰۰۱) توضیح داده شده استفاده شد. از هر تیمار سه تکرار بیولوژیک و از هر تکرار بیولوژیک، 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 نرم‌افزار SPSS انجام شد.

ارزیابی شدت بیماری

از هفته دوم بعد از کشت، علائم در گیاهان مایه‌زنی شده مشاهده گردید. علائم مشاهده شده در سه نقطه زمانی ۱۹، ۲۵ و ۳۱ dpi ارزیابی شده و با استفاده از مقیاس ذیل که توسط Friedmann و همکاران (۱۹۹۸) ذکر

1. Bush Beefsteak

2. Days post inoculation

جدول ۱. درجه‌بندی علایم آلودگی به بیماری کوتولگی

نمره	علایم
۰	بدون علایم
۱	موزائیک خفیف برگ
۲	موزائیک شدید برگ + کپه‌ای شدن برگ‌ها
۳	زردی و نکروز برگ + کپه‌ای شدن برگ‌ها
۴	زردی و نکروز برگ + کپه‌ای شدن برگ‌ها + کوتولگی

هر واکنش شامل ۱ میکرولیتر cDNA قالب، ۲ میکرولیتر از هر آغازگر و ۱۰ میکرولیتر سوپرمیکس SYBR Green (بایورد) بود. برنامه PCR شامل: ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و در آخر یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه به کار برده شد. بیان ژن‌های متیلاسیون با ترسیم یک منحنی استاندارد برای هر ژن اندازه‌گیری شد. سطح بیان این ژن‌ها برای هر نمونه نسبت به ژن مرجع (*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.

شده، با برخی اصلاحات پیشنهادی نمره‌دهی انجام شد (جدول ۱). شاخص شدت بیماری گیاه (PDS) در پاسخ هر تیمار به ویروس‌ها مطابق مقالات قبلی محاسبه شدند (Arunachalam *et al.*, 2002; Khoshnazar & Eini, 2016). به‌طور خلاصه:

$$PDS = \frac{\text{مجموع امتیاز عددی}}{\text{تعداد گیاهان آلوده مشاهده شده} \times 100} \times 100$$

حداکثر درجه بیماری)

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

بیان ژن‌های متیلاسیون

الگو بیان ژن‌های مربوط به متیلاسیون با استفاده از تکنیک RT-qPCR از برگ‌های گوجه‌فرنگی در ۱۹، ۲۵ و ۳۱ dpi بررسی شدند. 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 متیلاسیون توسط نرم‌افزار پرایمر ۳ (Primer 3) طراحی شدند (Rozen *et al.*, 2000).

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی	منبع
TBSV-GRAL	F: 5' TTTGGTAGGTTGTGGAGTGC3' R: 5' AAGGGTAAGGATGGTGAGGA3'	Harris <i>et al.</i> , 2006
MET1	F: 5' ACTCACCCGAGGTGTCAAAG3' R: 5' TTCCTCTCCGGAACATCATC3'	In this research
HEN1	F: 5' GCTAGCTCAGATGCCCATTC3' R: 5' GGAGGATGACCCAGATGAGA3'	In this research
ADK	F: 5' ACGCAGCAGCCAATAACAA3' R: 5' TCTTGCTTCTGTCTCATTTCCA3'	In this research
UBI3	F: 5'- TCCATCTCGTGCTCCGTCT-3' R: 5'-GAACCTTCCAGTGCATCAACC-3'	Song <i>et al.</i> , 2015

وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد (Ebrahimi et al., 2020).

نتایج و بحث

علائم ظاهری و شدت بیماری در گیاهان

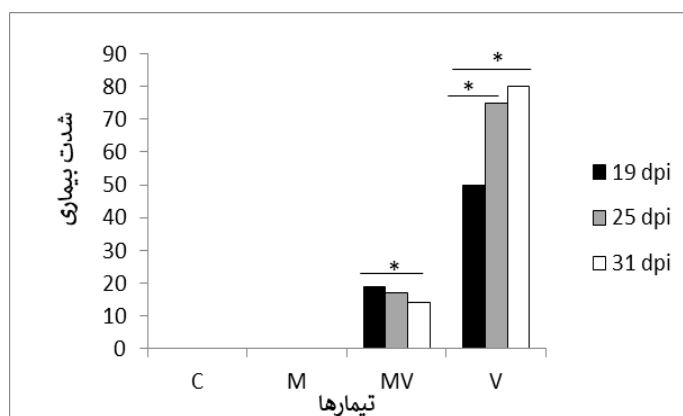
علائم ظاهری شدیدتر در گیاهان V نسبت به گیاهان MV (شکل ۱) در زمان‌های ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی مشاهده و به شرح جدول ۳ ثبت و امتیازدهی شد. نتایج آنالیز آماری نیز نشان داد که شدت علائم (PDS) در گیاهان V به‌طور معناداری بیشتر از گیاهان MV است. همچنین میزان شدت بیماری برای هر تیمار در سه زمان مختلف تفاوت معنادار داشت. هیچ علائمی از بیماری در گیاهان گروه کنترل مشاهده نشد ($P < 0.05$ ، شکل ۲).

ارزیابی زیست‌توده

هشتاد روز پس از کاشت، قسمت‌های روی زمینی گیاهان (هشت تکرار در هر تیمار) برای ارزیابی زیست‌توده (بایومس) 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 حدوداً چند سانتی‌متر از بالای طوقه قطع شدند و در پاکت کاغذی قرار گرفتند و بلافاصله توسط ترازوی دو صفر وزن شدند، سپس به منظور تعیین وزن خشک، پاکت‌های حاوی گیاهان در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه شبانه روز در آن قرار داده شدند تا آب گیاهان به طور کامل تبخیر شود و در نهایت با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱



شکل ۱. علائم ظاهری در گیاه آلوده به TBSV (V)، گیاه مایکوریزایی آلوده به TBSV (MV)، گیاه شاهد (C)



شکل ۲. شدت بیماری (PDS) در گیاهان شاهد (C)، گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان مایکوریزایی (M) و گیاهان مایکوریزایی آلوده به TBSV (MV) در ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi). تفاوت معنی‌داری بین شدت بیماری برای تیمارها در سه زمان مختلف توسط ستاره نشان داده شده است (اندازه‌گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی ($P < 0.001$)).

جدول ۳. علائم ظاهری در گیاهان، ویروسی (V) و گیاهان مایکوریزایی آلوده به TBSV (MV) در ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi) بر اساس سیستم نمره‌دهی *Friedmann et al.* (1998): نمره ۱ برای موزائیک خفیف برگ، نمره ۲ برای موزائیک شدید برگ و کپه‌ای شدن برگ‌ها، نمره ۳ برای زردی و نکروز و کپه‌ای شدن برگ‌ها و نمره ۴ برای زردی و نکروز برگ، کپه‌ای شدن برگ‌ها و کوتولگی

تیمار	نقطه زمانی	19	25	31
MV		1, 3	1, 2	1
V		2, 3	2, 3, 4	3, 4

نتایج RT-qPCR حاکی از کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های *ADK*، *HEN1*، *MET1* و *ADK* در گیاهان V در زمان‌های ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز بعد از مایه‌زنی گیاهان با ویروس نسبت به گیاهان MV بود. همچنین بیان بسیار کم این ژن‌ها در گیاهان C و M در مقایسه با گیاهان V و MV دیده شد. بین بیان ژن‌ها برای هر تیمار در سه زمان مختلف نیز تفاوت معنادار مشاهده شد (شکل ۴).

در پایان آزمایش میزان زیست‌توده بخش‌های روی زمینی تیمارها اندازه‌گیری شد. در گیاهان V، زیست‌توده بخش‌های روی زمینی به‌طور معناداری کاهش یافت ($P < 0.05$) و گیاهان MV نسبت به گیاهان V زیست‌توده بیشتری تولید کردند. این نتیجه توسط PDS بالاتر در گیاهان V تأیید شد (جدول ۴).

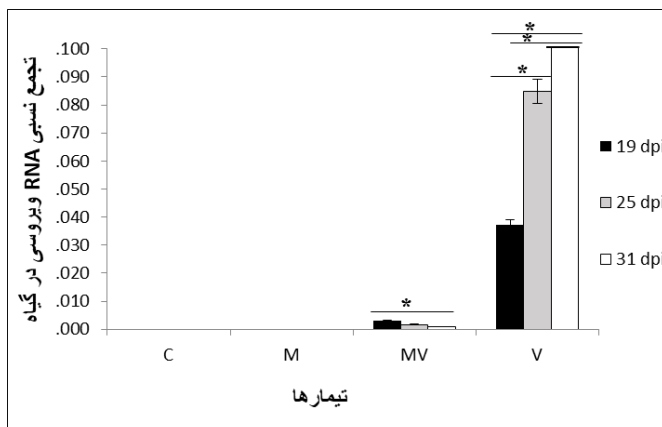
قارچ‌های مایکوریز غالباً تحمل گیاهان را در برابر تنش‌های زیستی و هم‌غیرزیستی بهبود می‌بخشند (Gernns *et al.*, 2001; Hildebrandt *et al.*, 2007; Pozo & Azcón-Aguilar., 2007; Pozo *et al.*, 2010). گزارش‌های کمی درباره تأثیر قارچ‌های مایکوریز بر بیماری‌های ویروسی وجود دارد. تحقیق حاضر به بررسی تأثیر قارچ مایکوریز *R. irregularis* بر آلودگی به ویروس TBSV در گیاهان گوجه‌فرنگی از طریق بررسی بیان ژن‌های متیلاسیون پرداخته است. در این مطالعه ابتدا در تیمار MV، نشاهای گوجه‌فرنگی جهت ایجاد همزیستی با قارچ مایکوریز *R. irregularis* تلقیح و سپس با TBSV مایه‌زنی شدند ولی در تیمار V تنها با TBSV مایه‌زنی شدند.

اثر مایکوریزا بر تجمع ویروس

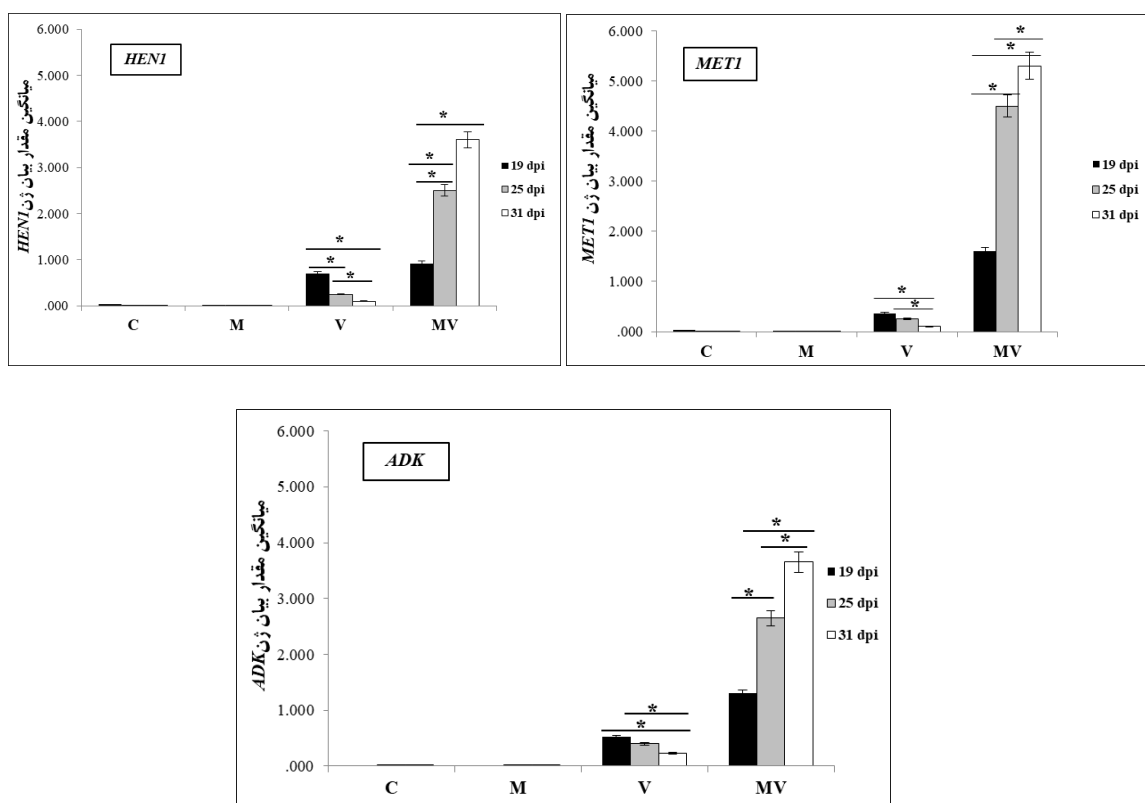
مقایسه تجمع TBSV به‌وسیله RT-qPCR در گیاهان V و MV نشان داد که گیاهان V نسبت به گیاهان MV سطح بالاتری از تجمع ویروسی را نشان می‌دهند. میزان تجمع ویروس ۱۹ روز پس از تلقیح در گیاهان مایکوریزایی آلوده به ویروس در مقایسه با گیاهان آلوده به ویروس فاقد مایکوریزا کاهش یافت. این کاهش غلظت ویروسی با کاهش علائم و شدت بیماری در گیاهان مایکوریزایی همراه بود. همچنین میزان ویروس در گیاهان MV در روز ۲۵ام کاهش یافت و در روز ۳۱ هم کمترین میزان ویروس در این گیاهان مشاهده شد و نشان داد که همزیستی *R. irregularis* در طول مدت باعث کاهش تجمع ویروس TBSV می‌شود. میزان غلظت ویروس در تیمار V نیز از زمان ۱۹ روز پس از تلقیح تا ۲۵ و ۳۱ روز پس از آن با گذشت زمان افزایش داشته است که این موضوع نشان‌دهنده این است که در بازه زمانی مشخص میزان تکثیر ویروس نیز در گیاهان ویروسی در مقایسه با گیاهان مایکوریزایی آلوده به ویروس بیشتر است.

نتایج بررسی آماری داده‌های RT-qPCR هم نشان داد که در تیمار MV میزان تجمع ویروس در هر سه زمان در سطح معنی‌داری کمتر از تیمارهای V بود. همچنین میزان تجمع RNA ویروسی برای هر تیمار در سه زمان مختلف تفاوت معنادار داشت ($P < 0.001$) (شکل ۳).

بیان ژن‌های متیلاسیون در گیاهان مایکوریزی آلوده به TBSV



شکل ۳. نتیجه RT-qPCR بر میزان تجمع TBSV در گیاهان شاهد (C)، گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان میکوریزی (M) و گیاهان میکوریزی آلوده به TBSV (MV) در سه مرحله از عفونت ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی (dpi). برای هر تیمار، سه گیاه آلوده توسط RT-qPCR مورد آزمایش قرار گرفت. 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 ($P < 0.001$)).



شکل ۴. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های *HEN1*، *MET1* و *ADK* توسط RT-qPCR در گیاهان کنترل (C)، گیاهان میکوریز (M)، گیاهان آلوده به TBSV (V) و گیاهان میکوریز آلوده به TBSV (MV) در سه مرحله از عفونت ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی (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 ($P < 0.001$)).

جدول ۴. وزن تر و خشک در گیاهان شاهد (C)، گیاهان آلوده به TBSV (V)، گیاهان مایکوریزایی (M) و گیاهان مایکوریزایی آلوده به TBSV (MV). مقادیر هر ستون که روبروی آن حروف مختلف است نشان دهنده تفاوت معنی دار وزن تر و خشک بین تیمارها است (اندازه گیری مکرر آنوا و آزمون تعقیبی بنفرونی ($P < 0.05$)).

تیمار	وزن تر *M ± SD	وزن خشک M ± SD
C	8 ± 0.4 b	3 ± 0.3 b
V	6 ± 0.5 a	1 ± 0.2 a
MV	7.9 ± 0.34 c	2 ± 0.2 c
M	8.6 ± 0.3 b	3.5 ± 0.4 b

* M ± SD = انحراف معیار ± میانگین

مایکوریز کردن بر کنترل ویروس بستگی به تعامل خاص گیاه میزبان، ویروس و قارچ مایکوریز دارد. تعامل بین قارچ‌های ویروس، گیاهی و AM یک سیستم چندوجهی است و عوامل متعددی مانند نوع و شیوه زندگی بیمارگر ویروسی، زمان تعامل و وضعیت تغذیه‌ای گیاه وجود دارد که این تعامل را به سمت نتیجه منفی یا مثبت سوق می‌دهد (Miozzi et al., 2011). حساسیت یا مقاومت گیاهان مایکوریزی در برابر ویروس ممکن است از مسیر متیلاسیون در گیاه صورت بگیرد (Wang et al., 2003).

در فرایند متیلاسیون یک گروه متیل (CH_3) به موقعیت ۵ حلقه سیتوزین اضافه می‌شود که این تغییر می‌تواند حذف بشود و یا بدون اینکه در ماهیت DNA تغییری ایجاد کند به نسل‌های بعدی انتقال یابد. متیلاسیون DNA بیشتر در جزایر GPC یعنی مناطقی که سیتوزین کنار گوانین قرار گرفته است اتفاق می‌افتد. محتوای اطلاعات توالی DNA اولیه را می‌توان با افزودن یک گروه متیل به ساختار حلقه سیتوزین و یا آدنین افزایش داد. تغییر شیمیایی DNA روی تعاملات پروتئین DNA اثر می‌گذارد. در پژوهشی مشخص شده است که همزیستی قارچ مایکوریز *F. mosseae* با *Geranium robertianum* باعث افزایش فرایند متیلاسیون

علائم شدید در گیاهان V در مراحل مختلف بعد از مایه‌زنی ویروس در مقایسه با گیاهان MV مشاهده شد. این نشان می‌دهد گیاهان گوجه‌فرنگی پس از مایکوریزی شدن در برابر عفونت TBSV مقاوم‌تر شدند. این یافته همراه با کاهش اندک زیست‌توده گیاهان MV در مقایسه با گیاهان V بود. علاوه بر این توسط RT-qPCR سطح بالاتری از تجمع TBSV در گیاهان V در مقایسه با سطح تجمع ویروس در گیاهان MV در ۱۹، ۲۵ و ۳۱ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد. بنابراین، همزیستی *R. irregulare* تجمع طولانی‌مدت TBSV در گوجه‌فرنگی 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 و همکاران (۲۰۱۹) در آزمایش گلخان‌های نشان دادند که مایکوریز کردن، گیاهان را در برابر ویروس موزائیک گوجه‌فرنگی محافظت می‌کند و منجر به کاهش قابل توجهی در سطح تجمع ویروس می‌شود. با این وجود قارچ مایکوریز *Piriformospora indica* باعث افزایش تجمع طولانی‌مدت ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی می‌شود (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., 2010). این ممکن است نشان دهد که اثر

از اتصال پروتئین‌های تنظیم‌کننده شود و متیلاسیون پروموتور و توالی کدکننده ژن می‌تواند رونویسی را در هر دو شرایط آزمایشگاهی یا طبیعی خاموش کند. (Matzke *et al.*, 2015).

متیلاسیون RNA نیز در تنظیم انواع فرایندهای بیولوژیکی و همچنین فرایندهای دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌های ویروسی نقش دارد و توسط فعالیت متیل ترانسفرازها کنترل می‌گردد. فرایند متیلاسیون RNA از طریق هیدرولیز کوفاکتور S-آدنوزیل-L-متیونین به S-آدنوزیل هوموسیستئین و اهدای یک گروه متیل (CH_3) به آدنین توسط آنزیم متیل ترانسفراز صورت می‌گیرد که N6-methyladenosine نامیده می‌شود. در نتیجه متیله کردن mRNA، در رونویسی RNA ویروسی اختلال ایجاد میشود. این فرضیه پیشنهاد شده است که گیاهان از استراتژی متیلاسیون RNA جهت سرکوب رونوشت‌های ویروسی و در نهایت دفاع از خود استفاده می‌کنند (Manners *et al.*, 2019). نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های مرتبط با متیلاسیون در گیاهان MV در هر سه زمان به‌طور معناداری از گیاهان V بیشتر بود. به این صورت که پس از گذشت ۱۹ روز از مایه‌زنی گیاهان با ویروس، میزان بیان ژن‌ها در گیاهان MV نسبت به گیاهان V افزایش یافت و این افزایش با گذشت زمان (۲۵ و ۳۱ روز بعد از مایه‌زنی) به‌طور معناداری بیشتر شد. این نشان می‌دهد که پاسخ‌های مقاومت به ویروس در گیاهان مایکوریز می‌تواند از مسیر متیلاسیون و از طریق افزایش برخی از ژن‌های مسئول متیله‌شدن در گیاه اتفاق بیفتد (Wang *et al.*, 2003).

در تحقیقی مشخص شده است که مقاومت گیاه *Arabidopsis thaliana* به ویروس موزاییک یونجه (AMV) و کاهش علائم این ویروس در گیاه همراه با افزایش متیلاسیون RNA ویروسی بوده است (Martinez-Perez *et al.*, 2017). در تأیید این نتایج نیز میزان تجمع ویروس در طی زمان در

میزبان می‌شود. اخیراً ژن‌های دخیل در متیلاسیون گیاه که در همزیستی با قارچ مایکوریزا تحت تأثیر قرار می‌گیرند، مورد بررسی قرار گرفته‌اند و نتایج به‌دست‌آمده بیانگر تغییر بروز این ژن‌ها در اندام‌های هوایی و ریشه گیاهان می‌باشد (Varga *et al.*, 2018).

براساس نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مشاهده شد که در گیاهان MV، ژن *HEN1* که از ژن‌های مؤثر در فرایند متیله‌شدن است افزایش بیان معنادار داشته است که نشان‌دهنده نقش مؤثر این ژن در فرایند دفاع علیه ویروس TBSV است (شکل ۴). *HEN1* در گیاهان یک متیل ترانسفراز است که گروه متیل را از کوفاکتور S-آدنوزیل-L-متیونین (AdoMet) به روی گروه OH ۲' از نوکلئوتید ۳' ترمینال مولکول‌های RNA دورشته ای منتقل می‌کند و در حفظ متیلاسیون و فرایند دفاع گیاه نقش دارد (Plotnikova *et al.*, 2014). همچنین افزایش معنادار بیان ژن‌های *ADK* و *MET1* در گیاهان MV مشاهده شد که نشان‌دهنده نقش دفاعی مؤثر آن‌ها علیه ویروس می‌باشد. هر دو این ژن‌ها به نوعی در فرایند متیلاسیون و دفاع گیاهان در برابر پاتوژن‌ها نقش دارند (Wang *et al.*, 2014). *ADK* آنزیمی است که نقش مهمی را در حفظ و نگهداری متیلاسیون ایفا می‌کند و به این ترتیب در مسیر دفاعی میزبان علیه ویروس از طریق خاموشی RNA و همین‌طور دفاع متابولیکی که از مسیر آنزیم SNF1 کیناز هدایت می‌گردد، نقش دارد (Lecoq *et al.*, 2001). آنزیم *MET1* نیز در حفظ الگوهای متیلاسیون به صورت اتصال به DNA نیمه متیله و بازگرداندن آن به حالت کاملاً متیله نقش دارد (Law & Jacobsen, 2010). حفظ متیلاسیون توسط آنزیم *MET1* باعث توقف یا کاهش نسخه‌برداری می‌شود که این فرایند به عنوان عامل دفاعی بر علیه ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها شناخته می‌شود (Matzke *et al.*, 2015).

در یوکاریوت‌ها، متیلاسیون DNA می‌تواند مانع

را به عنوان راهکاری برای مدیریت این بیماری ویروسی در کشاورزی معرفی نماییم.

سپاسگزاری

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

گیاهان MV در مقایسه با گیاهان V کاهش معنی‌داری نشان داد.

نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که قارچ‌های مایکوریزی به عنوان تحریک کننده سیستم دفاعی، ممکن است روش مناسبی برای دفاع گیاه در برابر بیماری TBSV باشند و شاید در آینده بتوانیم آن‌ها

REFERENCES

- Agrios JN (2010) Plant pathology. Fifth Edition. Translated by Izadpanah K, Bani Hashemi Z, Rahimian H, Minasian V, Iage Publications.
- Aseel DG, Rashad YM, Hammad SM (2019) *Arbuscular mycorrhizal* fungi trigger transcriptional expression of flavonoid and chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against Tomato Mosaic Virus. *Sci. Rep.* Volume 9, Article number: 9692.
- Arunachalam P, Radhakrishnan V, Mathew SK, Kumar PS (2002) Reaction of bitter melon genotypes against distortion mosaic virus. *Int. J. Veg. Sci.* 29: 55-57.
- Barbieri M, Acciarri N, Sabatini E, Sardo Accotto GP, Pecchioni N (2010) Introgression of resistance to two Mediterranean virus species causing Tomato Yellow Leaf Curl into a valuable traditional tomato variety. *J. Plant Pathol.* 92: 458-493.
- Ebrahimi S, Eini, O, Koolivand D (2020) *Arbuscular mycorrhizal* symbiosis enhances virus accumulation and attenuates resistance-related gene expression in tomato plants infected with Beet curly top Iran virus. *J. Plant Dis. Prot.* 1-8.
- Fakhro A, Andrade-Linares DR, Von BS, Bandte M, Büttner C, Grosch, R (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. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 1004-1007.
- Gerik JS, Duffus JE, Perry R, Stenger DC, Van Maren, AF (1990) Etiology of tomato plant decline in California desert. *Phytopathol.* 80: 1352-1356.
- Germans 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, Rottneest Island, Perth, Australia, November 8-11, p. 48.
- 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: p 153.
- Khoshnazar F, Eini O (2016) Response of tomato cultivars to agroinfection with Beet curly top Iran virus. *J. Crop Prot.* 5: 473-482.

- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11: 204-220.
- Lecoq K, Belloc I, Desgranges C, Daignan-Fornier B (2001) Role of adenosine kinase in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of the ADO1 gene and study of the mutant phenotype. *Yeast* 18: 335-342.
- 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. J.* 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.
- Maffei G, Miozzi L, Fiorilli V, Novero M, Lanfranco L, Accotto G P (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.
- Manners O, Baquero-Perez B, Whitehouse A (2019) m6A: Widespread regulatory control in virus replication. *Bba-Gene Regul Mech.* 1862(3): 370-381.
- Martinez-Perez M, Aparicio F, Lopez-Gresa MP, Belles JM, Sanchez-Navarro JA, Pallas V (2017) Arabidopsis m(6)A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m(6)A abundance in its genomic RNAs. *P Natl Acad Sci.* 114: 10755-10760.
- Matzke MA, Kanno T, Matzke AJM (2015) RNA-directed DNA methylation: the evolution of a complex epigenetic pathway in flowering plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66: 243-267.
- 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. *Mol Plant Microbe In.* 24: 1562-1572.
- Nawaz H, Umer M, Bano S, Usmani A, Naseer, M (2014). Research review on tomato bushy stunt virus disease complex. *J. Nat. Sci. Res.* 4: 18-23.
- Plotnikova A, Osipenko A, Masevic ius V, Vilkaitis G, Klimas auskas S (2014) Selective Covalent Labeling of miRNA and siRNA Duplexes Using HEN1 Methyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* 136: 13550-13553.
- Pozo MJ, 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. In *Arbuscular mycorrhizas: physiol.* pp. 193-207.
- Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM (2008) Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *J. Virol.* 82: 8997-9007.
- Rodriguez-Negrete E A, Lozano-Dura' n R, Piedra-Aguilera A, Cruzado L, Bejarano E R, Castillo AG (2013) Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytol.* 199: 464-475.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol,* 132: 365-386.
- Shaul O, Galili S, Volpin H, Ginzberg I, Elad Y, Chet I, Kapulnik Y (1999) Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Mol*

- Plant Microbe In. 12: 1000-1007.
- Sieverding E, Silva G, Berndt R, Oehl F. (2014) *Rhizoglyphus*, a new genus of the Glomeraceae. *Mycotaxon*. 129: 373-386.
- Timonen S, Smith SA, Smith SE (2001) Microtubules of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in symbiosis with tomato roots. *Can. J. Bot.* 79: 307-313.
- Varga S, Soulsbury CD (2018) *Arbuscular mycorrhizal* fungi change host plant DNA methylation systemically. *Plant Biol.*
- Wu B, Grigull, J, Ore M O, Morin S, White KA (2013) Global Organization of a Positive-strand RNA Virus Genome. *PLOS Pathogens*. 9: e1003363.
- Wang H, Hao L, Shung CY, Sunter G, Bisaro D M (2003) Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell*. 15: 3020-3032.
- 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.
- Wehner J, Antunes P M, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC (2010) Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53: 197-201.
- Whipps JM, (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82: 1198-1227.
- Yamamura Y, Scholthof HB (2005) Tomato bushy stunt virus: a resilient model system to study virus-plant interactions. *Mol. Plant Path.* 6: 491-502.
- Yang X, Xie Y, Raja P, Li S, Wolf JN, Shen Q, Zhou X (2011) Suppression of Methylation Mediated Transcriptional Gene Silencing by bC1-SAHH Protein Interaction during Geminivirus-Betasatellite Infection. *PLoS Pathog.* 7: e1002329.