

## کاربرد ریزوباکترهای پروبیوتیک گیاهی جهت کنترل زیستی ویروس موزایک توتون در میزبان گوجه‌فرنگی

میلاد آئینی<sup>۱\*</sup>، محمد حامد قدوم پاریزی پور<sup>۲</sup>، پرنیان پولادی<sup>۳</sup>

۱. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۰۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸)

### چکیده

ویروس موزایک توتون (TMV) از جمله ویروس‌هایی است که تولید محصول گوجه‌فرنگی را در مزرعه و گلخانه، به شدت کاهش می‌دهد. تحقیق حاضر جهت تعیین ترکیب مناسبی از ریزوباکترهای پروبیوتیک به منظور کاهش شدت بیماری ناشی از ویروس موزایک توتون در میزبان گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه صورت گرفت. از سه جدایه باکتری شامل *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* پس از اثبات خاصیت عدم آنتاگونیستی با یکدیگر، استفاده شد. غلظت  $10^8$  واحد تشکیل‌دهنده کلونی بر میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها به ریزوسفر گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی اضافه شد. گیاهچه‌ها به‌طور مکانیکی با TMV مایه‌زنی و به مدت شش هفته جهت ظهور علائم نگهداری شدند. داده‌های شدت علائم بیماری، غلظت ویروس در گیاهان آلوده و شاخص‌های رشدی گیاهان مایه‌زنی شده ثبت و مورد تجزیه و تحلیل آماری انجام گرفت. نتایج نشان داد که در تیمار ترکیب سه باکتری *P. putida*، *P. fluorescens* و *B. subtilis* شدت علائم و تجمع TMV در گیاهان گوجه‌فرنگی در مقایسه با سایر تیمارها، کاهش معنی‌داری دارد. در مقابل، شاخص‌های رشدی گیاه با کاربرد این ترکیب باکتریایی، افزایش معنی‌داری را در مقایسه با دیگر تیمارها نشان داد. این نتایج نشان داد که ترکیبی از ریزوباکترهای پروبیوتیک دارای اثر هم‌افزایی بوده و می‌تواند موجب کاهش غلظت ویروس و افزایش مؤلفه‌های رشدی گیاه میزبان گردد.

واژه‌های کلیدی: الیزای غیرمستقیم، مایه‌زنی، چگالی نوری، شدت بیماری.

### Management of Tobacco mosaic virus by some plant probiotic bacteria in tomato plant

Milad Aeyni<sup>1\*</sup>, Mohamad Hamed Ghodoum Parizipour<sup>2</sup>, Parnian Pooladi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Plant protection, Agricultural Sciences and natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

<sup>3</sup>Master of Science in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

(Received: January 27, 2019 - Accepted: April 28, 2019)

#### ABSTRACT

Tobacco mosaic virus (TMV) is considered as a devastating virus which significantly reduces the tomato yield. This investigation aimed to find an efficient combination of plant probiotic bacteria to control TMV in tomato. Suspensions of *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, and *Bacillus subtilis* were prepared at the concentration of  $10^8$  colony forming unit per milliliter. Tomato seedlings, were treated with probiotic bacteria by adding 100 milliliters of suspension. Afterward, seedlings were inoculated with TMV and were inspected for six weeks. Subsequently, an indirect-ELISA test using TMV specific polyclonal antibody was used to compare the relative virus titer in the plants of each treatment. The experiment was conducted in a completely randomized design with nine treatments and six replicates, respectively. Results showed that the OD measured in the mixed bacterial treatment was lower (0.08) in comparison to the positive control (0.87) ( $p < 0.05$ ). Application of *B. subtilis* resulted in the higher OD (0.45) compared to the other treatments ( $p < 0.05$ ). Additionally, plant growth indicators including fresh and dry weight of root and above ground tissues of tomato as well as height of tomato plants and chlorophyll content were recorded. Application of plant probiotic bacteria significantly increased these indices in TMV-inoculated tomato plants compared to the control. The overall results showed that the mixture of three bacteria had a synergistic effect, so that they showed higher decrease in disease severity in comparison to the control.

**Keywords:** Indirect ELISA, Inoculation, Optical density, Disease severity.

\* Corresponding author E-mail: m.aeyni@scu.ac.ir

## تازه‌های تحقیق

تاکنون تحقیق جامعی در ارتباط با ریزوباکتری‌های پروبیوتیک گیاهی جهت کنترل زیستی ویروس موزاییک توتون در میزبان گوجه‌فرنگی در دنیا صورت نپذیرفته است؛ بنابراین، تحقیق حاضر باهدف تعیین جدایه باکتری مناسب یا ترکیبی از جدایه‌ها جهت کاهش علائم ناشی از ویروس TMV در میزبان گوجه‌فرنگی انجام پذیرفته است. در این تحقیق مشخص شد که ترکیبی از سه جدایه ریزوباکتری‌های پروبیوتیک سبب کاهش غلظت ویروس موزاییک توتون در گوجه‌فرنگی می‌شوند.

## مقدمه

در میان ویروس‌های گیاهی، ویروس موزاییک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*) از جنس *Tobamovirus* و تیره *Virgaviridae* یکی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی است که پایداری بسیار زیادی دارد (Adams et al. 2017). دامنه میزبانی این ویروس بسیار وسیع است، به طوری که توانایی آلوده کردن بیش از ۳۵۰ گونه گیاهی را دارد. از گیاهانی که تحت تأثیر این ویروس قرار می‌گیرند می‌توان به گوجه‌فرنگی، توتون، فلفل، بادمجان، لوبیا، سلمه‌تره و غیره اشاره کرد (Vinayarani et al. 2011). نشانه‌های آلودگی به شکل‌های مختلفی مانند موزاییکی شدن، پیسک، زردی، بدشکلی و کاهش رشد برگ‌ها و کوتولگی، پیچیدگی و سوختگی کل گیاه و همچنین موزاییک و بدشکلی میوه بروز پیدا می‌کنند (Hull 2014). خسارت ناشی از آلودگی محصولات کشاورزی به ویروس موزاییک توتون بسیار قابل توجه است، بدین ترتیب که در برخی از مزارع گوجه‌فرنگی خسارت این بیماری بیش از ۵۹ درصد نیز گزارش شده است (Alishiri et al. 2013).

مدیریت بیماری‌های ویروسی غالباً شامل استفاده از واریته‌های ژنتیکی مقاوم، مدیریت تلفیقی روش‌های زراعی و استفاده از حشره‌کش‌ها جهت جلوگیری از انتشار ناقل بیماری است (Hull 1989, Agrios 2005, Hull 2014). استفاده از هریک از

روش‌های فوق دارای محدودیت‌هایی است که کاربرد این روش‌ها را با مشکل مواجه می‌سازد. برای مثال، کاربرد آفت‌کش‌ها در قرن اخیر علاوه بر از بین بردن میکروارگانیسم‌های مفید، سبب آلوده‌سازی محیط زیست شده و نگرانی‌های زیست‌محیطی فراوانی را به وجود آورده است. با توجه محدودیت‌های ذکر شده، به کارگیری روش‌های سازگار با محیط زیست از جمله استفاده از عوامل میکروبی پروبیوتیک جهت کنترل زیستی بیمارگر-های گیاهی، ضروری به نظر می‌رسد (Ab Rahman et al. 2018, Koch et al. 2018). در سالیان اخیر، استفاده از باکتری‌ها به عنوان استراتژی مناسب و جایگزین جهت کنترل بیماری‌های گیاهی معرفی شده است (Raupach and Kloepper 1998, Zehnder et al. 2000, del Carmen et al. 2018, Singh et al. 2019). در این میان باکتری‌های *P. putida fluorescens* و *B. subtilis* به عنوان عوامل پروبیوتیک شناخته شده‌اند و دارای توانایی زیادی در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند (Saini et al. 2015, del Carmen et al. 2018, Singh et al. 2019).

کنترل زیستی برخی از ویروس‌های بیمارگر گیاهی مانند ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus, TSWV*) و ویروس نکروز آفتابگردان (*Sunflower necrosis virus, SNV*) به وسیله باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی گزارش شده است (Kandan et al. 2005, Srinivasan et al. 2005). همچنین در گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با باکتری‌های *B. pumilus* و *B. subtilis amyloliquefaciens* برابر آلودگی به ویروس پیسه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato mottle virus, ToMoV*) کاهش معنی‌داری در وقوع و شدت بیماری ناشی از این ویروس مشاهده گردیده است (Murphy et al. 2000). با توجه به پتانسیل ریزوباکترها در کنترل زیستی عوامل بیمارگر، این پژوهش با هدف بررسی کاهش غلظت ویروس و افزایش مؤلفه‌های رشدی میزبان گوجه‌فرنگی آلوده به TMV در شرایط

گلخانه صورت گرفت.

### تهیه سوسپانسیون باکتری

جهت تهیه سوسپانسیون از جدایه‌ها، ابتدا بر روی محیط کشت آگار مغذی (NA) کشت، سپس در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس این جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت بروث (NB) مایه‌زنی و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سوسپانسیون باکتری به مدت پنج دقیقه با سرعت شش‌هزار دور در دقیقه، سانتریفیوژ و محلول رو-نشین دور ریخته شد. سپس ته‌نشین در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH ۷) به حالت سوسپانسیون یکنواخت درآمد. جهت یکسان کردن جمعیت باکتری-های کشت داده‌شده، غلظت باکتری در هر سوسپانسیون برابر با  $10^8$  واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) یکسان‌سازی شد. در تیمار ترکیبی از جدایه‌ها، سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها تهیه، سپس دو یا سه سوسپانسیون با حجم یکسان مخلوط شدند.

### مطالعات گلخانه‌ای

این آزمایش در گلخانه‌ی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز در سال ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد. بذر گوجه‌فرنگی رقم M16 از محل کلکسیون بذور دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد. جهت استریل سطحی، بذرها به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰٪ و به مدت ده دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد غوطه‌ور شدند. سپس بذرها ده بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بذور به مدت یک شبانه‌روز جهت خشک شدن در دمای اتاق قرار گرفتند. بذور گوجه‌فرنگی در داخل سوسپانسیون باکتری به غلظت  $10^8$  واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر به مدت یک ساعت قرار گرفتند (Zehnder et al. 2000). در تیمارهای شاهد بجای سوسپانسیون باکتری، از آب مقطر استریل استفاده شد. شش تکرار به ازای هر تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. سپس دو بذر در هر گلدان استریل حاوی پیت‌ماس

### مواد و روش‌ها

#### جدایه‌های باکتری

تعداد سه جدایه باکتری مورد استفاده در این پژوهش شامل *P. putida*، *P. fluorescens* Sc21 و *B. subtilis* Sc13 و Sc42 از کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، تهیه گردید. جدایه‌های مذکور جهت اثبات عدم خاصیت آنتاگونیستی علیه یکدیگر بر اساس روش جتیانون و کلوپر بررسی شدند (Jetyanon and Kloepper, 2002). پس از اثبات عدم خاصیت آنتاگونیستی، جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت بروث (NB) کشت داده و در لوله‌های حاوی بیست درصد گلیسرول تقسیم شدند. محتویات تیوب‌های فوق ابتدا با استفاده از ازت مایع منجمد گردید و سپس در دمای منفی هشتاد درجه سلسیوس جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

#### تکثیر و مایه‌زنی ویروس

به‌منظور آلوده‌سازی گیاهان گوجه‌فرنگی از عصاره گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) آلوده به TMV به‌عنوان مایه‌ی بیماری‌زا استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا برگ‌های جوان و دارای علائم موزاییک و بدشکلی از گیاه آلوده برداشت شد و سپس عصاره گیاهی آلوده به ویروس با استفاده از هاون و به همراه بافر ۰/۰۵ مولار فسفات پتاسیم (pH ۷) تهیه گردید. همگن‌های حاصل روی برگ‌های جوان گیاه سالمی که قبلاً با پودر کربوراندوم ۶۰۰ گردپاشی شده است، مالیده شد. گیاهان مایه‌زنی-شده تا ظهور نشانه‌های آلودگی در شرایط گلخانه نگهداری شدند. از میزبان توتون جهت تکثیر TMV در گلخانه استفاده گردید. پس از گذشت ده الی چهارده روز بعد از مایه‌زنی، با مشاهده‌ی علائم بیماری، برگ‌های آلوده به TMV جمع‌آوری و در دمای منفی هشتاد درجه سلسیوس جهت انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

آزمایشگاهی اتوکالیبره (AND, Japan) با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. خوانش عدد دستگاه کلروفیل‌متر دستی از روش غیر تخریبی با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج SPAD (Minolta, Japan) صورت گرفت (Mujdeci et al. 2011). به این صورت که از سه قسمت برگ شامل ابتدا، وسط و انتها اندازه‌گیری و میانگین آن برای گیاه موردنظر ثبت شد. این دستگاه میزان نور قرمز طول‌موج ۶۵۰ نانومتر عبور کرده از برگ را که به مقدار زیادی توسط کلروفیل جذب شده و نقش مؤثری در فتوسنتز دارد را نسبت به نور ناحیه مادون‌قرمز در طول موج ۹۴۰ نانومتر محاسبه می‌کند (Peng et al. 1999).

#### اندازه‌گیری شدت بیماری

اندازه‌گیری میزان شدت بیماری در دو زمان، سه و شش هفته بعد از مایه‌زنی ویروس با مقایسه چشمی علائم بیماری صورت پذیرفت. شدت بیماری با استفاده از مقیاس‌های زیر محاسبه شد: ۰ = فاقد علائم = ۲ علائم موزاییک خفیف در برگ‌ها = ۴ موزاییک شدید در برگ‌ها = ۶ موزاییک و تغییر شکل برگ‌ها = ۸ موزاییک و بدشکلی شدید برگ‌ها = ۱۰ موزاییک و بدشکلی شدید برگ‌ها همراه با کوتولگی بوته‌ها. تعیین میزان شدت بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Zehnder et al. 2000):

$$\text{شدت بیماری} = \frac{\sum (\text{تعداد گیاهان در آن مقیاس} \times \text{مقیاس بیماری})}{(\text{بالاترین مقیاس بیماری} \times \text{تعداد کل گیاهان})} \times 100$$

از شرکت Bioreba کشور سوئیس تهیه گردید. همچنین از بافت برگ‌های سالم به‌عنوان شاهد منفی (سالم) و از گیاه آلوده توتون به‌عنوان شاهد مثبت (آلوده) در این آزمون استفاده گردید. شش تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. نتایج بر اساس تغییر رنگ چاهک‌های الیزا توسط دستگاه الیزا (Thermo Fisher Scientific, Germany) خوانش شد و میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج

و پرلیت استریل (۱:۳) کشت شدند. گلدان‌ها با آب مقطر استریل آبیاری و در مواقع لزوم از کود قابل‌حل در آب (NPK) ۲۰:۲۰:۲۰ به مقدار مساوی در هر تیمار استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی شصت تا هشتاد درصد نگهداری شدند. گیاهان در مرحله ۴-۳ برگی به‌صورت مکانیکی با عصاره گیاهی آلوده به TMV مایه‌زنی شدند. پس از مایه‌زنی ویروس، هر گلدان با یکصد میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری (به‌تنهایی یا مخلوطی از دو و یا سه جدایه) با غلظت  $10^8$  واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر، به ریزوسفر گیاه مایه‌زنی گردید. افزودن باکتری‌ها به ناحیه ریزوسفر یک‌بار در دو هفته و جمعاً سه بار تکرار شد. تیمارهای شاهد شامل شاهد سالم (گیاه مایه‌زنی شده با بافر فسفات پتاسیم) و شاهد آلوده (گیاه مایه‌زنی شده با TMV) بودند. گلدان‌ها به مدت شش هفته جهت ظهور علائم نگهداری شدند.

#### اندازه‌گیری شاخص‌های رشد گیاهی

وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و ارتفاع بوته در پایان آزمایش اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری ارتفاع بوته، با کمک خط‌کش از محل طوقه تا انتهای ساقه اندازه‌گیری به عمل آمد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به‌طور جداگانه در پاکت‌های کاغذی به مدت چهار روز در دمای هفتاد درجه سلسیوس خشک و سپس با کمک ترازوی

#### آزمون الیزا

جهت تعیین غلظت ویروس شش هفته بعد از مایه‌زنی از تیمارهای نمونه‌گیری و پس از عصاره‌گیری با آزمون الیزای غیرمستقیم و با استفاده از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای علیه TMV به روش کلارک و آدامز میزان جذب نوری (چگالی نوری) آن‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Clark and Adams, 1977). آنتی‌سرم‌های مورد استفاده جهت ویروس

تحقیق عبارتند از: *P. fluorescens* Sc21 (SC21)، *B. subtilis* (Sc 13) Sc42، *P. putida* Sc42 و *P. fluorescens* Sc21، Sc13 *B. subtilis* (Sc42 + Sc21)، *P. putida* Sc42، *B. subtilis* (Sc21+ Sc13) Sc13 *P. fluorescens* (Sc13+Sc42) *B. subtilis* Sc13+ *B. subtilis* Sc13 + *P. putida* Sc42+Sc21 (Sc13+Sc21+Sc42)، شاهد آلوده و شاهد سالم. طرح آماری استفاده شده، طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار بوده و مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن با سطح احتمال خطای آلفا برابر ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

در این پژوهش از سه جدایه باکتری جداگانه و در ترکیب با یکدیگر، جهت بررسی توانایی آن ها در القای رشد در میزبان گوجه فرنگی و کاهش شدت بیماری ناشی از TMV مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۱۴-۱۸ روز از مایه زنی مکانیکی گیاهچه های گوجه فرنگی، علائم بیماری شامل موزاییک و بدشکلی برگ ظاهر شدند (شکل ۱). نتایج آزمون الایزا نشان داد که در نمونه های گیاهی حاوی علائم، آنتی ژن متعلق به TMV وجود دارد و در ادامه آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی منجر به تکثیر قطعه ۸۰۴ جفت بازی از ژنوم TMV گردید که نشان از ردیابی ویروس در گیاهان آلوده بود (شکل ۲).

۴۰۵ نانومتر ثبت گردید. نمونه هایی با میزان جذب نوری بیش از M+3SD (M میانگین چگالی نوری نمونه های سالم، SD انحراف استاندارد میانگین نمونه های سالم)، مثبت در نظر گرفته شدند.

### ردیابی ملکولی ویروس

به منظور ردیابی و تأیید آلودگی به TMV در تعدادی از گلدهان های نماینده که در آزمون الایزا نتایج مثبتی نشان دادند، محتوای RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (Denazist, Iran) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. برای ساخت cDNA، بعد از استخراج RNA قطعه DNA مکمل سنتز شد. در ادامه، واکنش زنجیره ای پلی-مراس (PCR) با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی دژنه برای ردیابی توپاموویروس ها شامل Tob-Uni 1 (5'-ATTTAAGT ) و Tob-Uni 2 (3'-GGASGGAAAAVCACT) و تکثیر (3'-GTYGTGATGAGTTCRTGGA) و تکثیر قطعه ای از ژنوم ویروس با اندازه ۸۰۴ جفت باز انجام گرفت (Letschert et al. 2002).

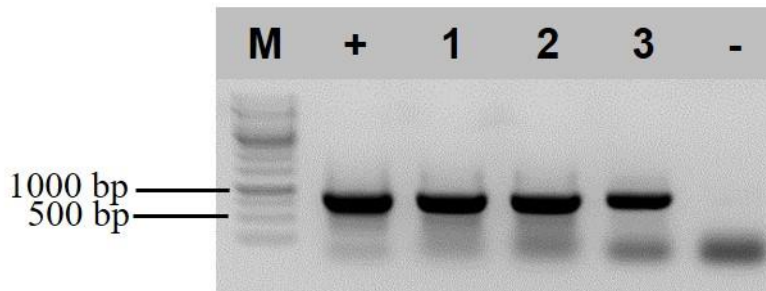
### تجزیه و تحلیل داده ها

کلیه داده های جمع آوری شده در طول آزمایش با استفاده از نرم افزار Excel ویرایش و برای تجزیه و تحلیل آماری آماده شدند. واکاوی داده ها با استفاده از نسخه ۹/۴ نرم افزار آماری SAS صورت گرفت (Yuan 2011). تیمارهای استفاده شده در این



شکل ۱- علائم موزاییک و بدشکلی برگ گوجه فرنگی در تیمار Sc21+ Sc13 (a) و Sc42 (b) پس از مایه زنی با TMV در مقایسه با شاهد سالم (c).

Figure1- Mosaic and malformation of tomato in various treatments inoculated with TMV (a , b) in comparison to the healthy control (c).



شکل ۲- نقوش الکتروفورز محصول‌های PCR که نشان‌دهنده تکثیر بخشی از ژنوم TMV با اندازه ۸۰۴ جفت باز است. چاهک‌های ۱-۳ متعلق به تیمارهای گوجه‌فرنگی. +: شاهد آلوده، -: شاهد سالم، M: نشان‌گر ملکولی یک کیلو بازی (Thermo Fisher Scientific, Germany).

Figure2- Agarose gel electrophoresis of PCR-products of TMV and amplification products of 804 bp. M: 1 KB ladder (Thermo Fisher Scientific, Germany), 1-3 tomato infected treatments, (+) infected control and (-) healthy control.

ویروس اندازه‌گیری شد. کلروفیل مهم‌ترین رنگیژه فتوسنتزی در گیاه محسوب می‌شود که نقش فیزیولوژیک گوناگونی در گیاه ایفا می‌کند و از نظر جذب و به‌کارگیری انرژی نورانی در فتوسنتز نقش اساسی و اولیه دارد؛ بنابراین هرگونه تأثیر روی کلروفیل به‌طور مستقیم بر فتوسنتز نیز تأثیر دارد. یکی از دلایل تغییر در غلظت کلروفیل، صدمات و جراحت‌هایی که به گیاه در حین اندازه‌گیری غلظت کلروفیل وارد می‌شود؛ از این‌رو به‌کارگیری روشی از اندازه‌گیری که تخریبی نباشد از اهمیت خاصی برخوردار است. بیشتر روش‌هایی که تاکنون برای تجزیه رنگ‌دانه و اندازه‌گیری غلظت کلروفیل در گیاه به‌کاربرده می‌شود، تخریبی و به‌طور کلی پرهزینه و وقت‌گیر هستند. یکی از روش‌های غیر تخریبی برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل در گیاه، استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج دستی است که اخیراً رایج شده است (Sims and Gamon 2002). به‌طور کلی کاهش میزان شاخص خوانش کلروفیل‌سنج نشانه کاهش سبزیگی گیاه و در نتیجه کاهش میزان کلروفیل گیاه است، این پدیده در نهایت سبب کاهش قدرت فتوسنتزی گیاه خواهد شد (Buttery and Buzzell 1977, Kura-Hotta et al. 1987, Guo and Li 1996, Murchie and Horton 1997, Croft et al. 2017, آلودگی به ویروس‌ها غالباً منجر به کاهش میزان

در پایان انجام آزمایش شاخص‌های رشدی نظیر وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی و ارتفاع بوته مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی وزن تر اندام‌های هوایی، تیمار Sc21+Sc42+Sc13 (ترکیبی از جدایه‌های *P. putida fluorescens* و *B. subtilis*) موفق‌تر از سایر تیمارها عمل نمود و بیشترین میزان (۴۷/۳ گرم) اختلاف معنی‌دار نسبت به شاهد آلوده (۲۶/۶۱ گرم) ثبت شد ( $p < 0.05$ )، در حالی که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد سالم (۴۲/۲۳) مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). همچنین بیشترین میزان وزن خشک ریشه (۸۹/۰ گرم)، وزن خشک اندام‌های هوایی (۱۲/۳ گرم)، وزن تر ریشه (۲/۹۳ گرم) در تیمار Sc21+Sc42+Sc13 در مقایسه با سایر تیمارها و شاهد آلوده به ویروس مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۱). در بررسی ارتفاع بوته، بیشترین اختلاف معنی‌دار در تیمار Sc21+Sc42+Sc13 معادل ۶۷/۸۳ سانتی‌متر در مقایسه با شاهد آلوده به ویروس (۴۴/۶۶ سانتی‌متر) اندازه‌گیری شد ( $p < 0.05$ ). در اندازه‌گیری میزان شاخص کلروفیل، اختلاف معنی‌داری میان تیمار Sc21+Sc42+Sc13 و شاهد سالم مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). همچنین، کمترین میزان شاخص کلروفیل در تیمار Sc21+Sc42 معادل ۲۵ و بیشترین میزان معادل ۳۵/۴ در تیمار Sc21+Sc42+Sc13 در مقایسه با شاهد آلوده به

در متابولیسم، کاهش تولید ماده خشک که در نتیجه سبب کاهش عملکرد گیاه می شود (Balachandran *et al.* 1997, Berger *et al.* 2007, ) (Radwan *et al.* 2007).

Robert *et al.* 1982, ) می شود ( Balachandran *et al.* 1994, Daley 1995, Guo *et al.* 2005, Shimura *et al.* 2011). این شرایط پیامدهای فیزیولوژیکی و کارکردی مهمی را در بردارد که عبارتند از: کاهش میزان ظرفیت فتوسنتزی، کاهش تثبیت دی اکسید کربن، اختلال

جدول ۱- مقایسه میانگین چگالی نوری (OD)، شاخص کلروفیل و سایر شاخص های رشد گیاهی در میزبان گوجه فرنگی آلوده به TMV در اثر تلقیح با باکتری های پروبیوتیک.

Table 1- Mean comparison of optical density, chlorophyll index, and other plant growth parameters in tomato treated with probiotic bacteria and challenged with TMV.

Bacterial strain	Optical density	Chlorophyll index	Plant height (centimeters)	Root fresh weight (gram)	Fresh weight of above ground tissues (gram)	Root dry weight (gram)	Dry weight of above ground tissues (gram)
Sc21	0.27 <sup>c</sup>	35.03 <sup>b</sup>	54.31 <sup>b</sup>	1.47 <sup>cb</sup>	29.63 <sup>b</sup>	0.6 <sup>cb</sup>	8.9 <sup>b</sup>
Sc42	0.42 <sup>b</sup>	31.16 <sup>ab</sup>	56.91 <sup>b</sup>	1.69 <sup>cb</sup>	32.63 <sup>b</sup>	0.56 <sup>cb</sup>	8.2 <sup>bc</sup>
Sc13	0.44 <sup>b</sup>	25.43 <sup>b</sup>	54.53 <sup>b</sup>	1.53 <sup>cb</sup>	28.57 <sup>b</sup>	0.57 <sup>cb</sup>	5.74 <sup>bc</sup>
Sc21+Sc42	0.18 <sup>c</sup>	25 <sup>b</sup>	55.25 <sup>b</sup>	1.88 <sup>cb</sup>	31.28 <sup>b</sup>	0.74 <sup>ab</sup>	6.34 <sup>bc</sup>
Sc13+Sc21	0.22 <sup>c</sup>	27.16 <sup>b</sup>	58.06 <sup>b</sup>	1.72 <sup>cb</sup>	31.86 <sup>b</sup>	0.65 <sup>cab</sup>	8.65 <sup>b</sup>
Sc42+Sc13	0.25 <sup>c</sup>	28 <sup>b</sup>	57.2 <sup>b</sup>	1.71 <sup>cb</sup>	31.81 <sup>b</sup>	0.63 <sup>cb</sup>	7.75 <sup>bc</sup>
Sc21+Sc42+Sc13	0.08 <sup>d</sup>	35.4 <sup>a</sup>	67.83 <sup>a</sup>	2.93 <sup>a</sup>	47.3 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	12.3 <sup>a</sup>
Positive control (TMV inoculated)	0.78 <sup>a</sup>	18.43 <sup>c</sup>	44.66 <sup>c</sup>	1.13 <sup>c</sup>	26.61 <sup>b</sup>	0.42 <sup>c</sup>	4.9 <sup>c</sup>
Negative control (Healthy plant)	0 <sup>d</sup>	36.98 <sup>a</sup>	55.08 <sup>b</sup>	2.23 <sup>ab</sup>	42.23 <sup>a</sup>	0.8 <sup>ab</sup>	13.1 <sup>a</sup>
SEM	0.02	2.086	2.56	0.456	2.32	0.075	1.063
P- treat	$p < 0.0001$	$p < 0.0002$	$p < 0.0015$	$p < 0.006$	$p < 0.0001$	$p < 0.0107$	$p < 0.0004$

بر اساس آزمون دانکن، ستون دارای حروف مشترک در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند.

Columns with same letter are not significantly different at probability level  $P \leq 0.05$  according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

مقایسه چشمی که در دو نوبت بعد از سه و شش هفته پس از مایه زنی صورت پذیرفت، تیمار Sc21+Sc42+Sc13 از سایر تیمارها موفق تر عمل کرده و شدت بیماری کمتری نسبت به تیمار شاهد آلوده مشاهده شد (جدول ۲). در این پژوهش جهت تعیین دقیق تجمع ویروس ها در بافت گیاهان از آزمون الایزا غیرمستقیم استفاده شد. آزمون الایزا ساده ترین روش ارزیابی وجود یا عدم وجود ویروس در گیاهان است و علاوه بر تعیین مثبت یا منفی بودن آلودگی به ویروس (سنجش کیفی)، می توان بر اساس میزان چگالی نوری (OD) در این آزمون، غلظت ویروس در نمونه های مختلف را نیز مقایسه کرد (سنجش کمی) (Montasser *et al.* 2006). نتایج نشان داد که در تیمار ترکیب سه باکتری P.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که به- کارگیری مخلوطی از ریزوباکترهای پروبیوتیک، سبب افزایش میزان کلروفیل در برگ و در نتیجه افزایش میزان فتوسنتز در گیاه می شوند. لنین و جیانتین با استفاده از ترکیبی از ریزوباکتری ها سبب افزایش محتوی کلروفیل در گل پریش (Catharanthus roseus) شدند که با نتایج حاصل از این تحقیق سازگار است (Lenin and Jayanthi, 2012). در طی سالیان اخیر استفاده از روش نمره- دهی چشمی در تخمین شدت بیماری ناشی از ویروس های گیاهی با استفاده از مقیاس های معین کاربرد زیادی داشته است؛ اما استفاده از این روش دارای محدودیت هایی است (Martinelli *et al.* 2015). در تعیین میزان شدت بیماری به روش

آزمون الایزا در تیمار ترکیبی از سه جدایه (Sc21+Sc42+Sc13) با نتایج حاصل از بررسی شدت بیماری به روش مقایسه چشمی همخوانی دارد. در تیمار Sc13 بیشترین میزان OD نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد، درحالی که شاخص شدت بیماری این تیمار از Sc21 کم تر است. از دلایل تفاوت شاخص شدت بیماری و نتایج آزمون الایزا می تواند پنهان ماندن آلودگی ویروسی در گیاه میزبان باشد، به همین دلیل، انجام آزمون دقیق تری مانند الایزا ضروری به نظر می رسد.

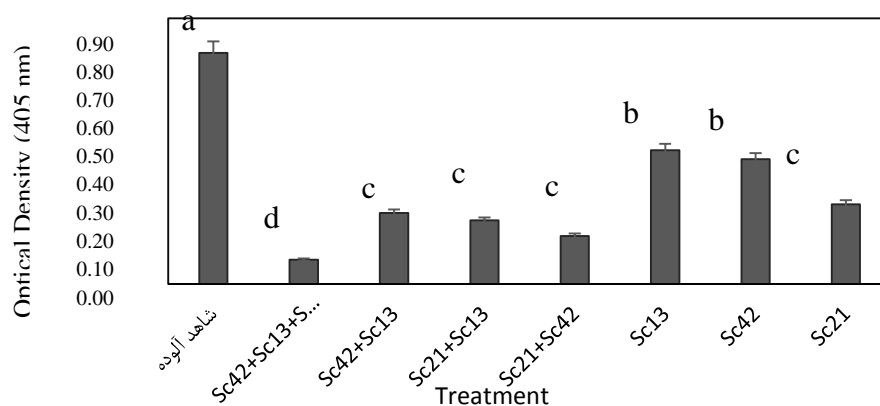
*B. subtilis* و *P. fluorescens putida* میزان OD کمتری (۰/۰۸) نسبت به شاهد آلوده (۰/۷۸)، مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). همچنین در تیمار باکتری *B. subtilis* (Sc13) نسبت به سایر تیمارها، میزان OD بیشتری (۰/۴۴) مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (جدول ۲، نمودار ۱). همچنین در کاربرد جدایه Sc21 کاهش معنی داری در میزان OD نسبت به تیمارهای Sc13 و Sc42 مشاهده شد. این نتایج نشان داد که کاربرد باکترهای پروبیوتیک گیاهی می تواند منجر به کاهش معنی داری در تجمع TMV در میزبان گوجه فرنگی شود. نتایج به دست آمده از

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری در اثر کاربرد باکتری های پروبیوتیک جهت بازداری از علائم بیماری ناشی از TMV در میزبان گوجه فرنگی.

Table 2- Mean disease severity values for different treatments in tomato treated with probiotic bacteria and challenged with TMV.

Treatment	Disease severity (%) three weeks post inoculation TMV	Disease severity (%) six weeks post inoculation TMV
Sc21	67.3 <sup>b</sup>	64.66 <sup>b</sup>
Sc42	55.66 <sup>c</sup>	54 <sup>de</sup>
Sc13	57.33 <sup>c</sup>	56.3 <sup>c</sup>
Sc21+Sc42	48.66 <sup>c</sup>	48 <sup>d</sup>
Sc13+Sc21	57.33 <sup>c</sup>	54 <sup>de</sup>
Sc42+Sc13	56 <sup>c</sup>	60.33 <sup>bc</sup>
Sc21+Sc42+Sc13	30 <sup>d</sup>	27.66 <sup>e</sup>
Positive control (TMV inoculated)	78.66 <sup>a</sup>	81.66 <sup>a</sup>
Negative control (healthy plant)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>f</sup>
SEM	2.67	2.14
P-treat	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

بر اساس آزمون دانکن، ستون دارای حروف مشترک در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند. Columns with same letter are not significantly different at probability level  $P \leq 0.05$  according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT)



نمودار ۱- میانگین چگالی نوری (OD) به دست آمده با آزمون الایزا غیرمستقیم تیمارهای مختلف باکتری های پروبیوتیک در گوجه فرنگی مایه زنی شده با TMV. بر اساس آزمون دانکن، ستون دارای حروف مشترک در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند.

Diagram 1- (ELISA) values, and severity of tomato treated with probiotic bacteria and challenged with TMV. Means followed by different letters within a column represent a significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).



کارهایی مانند افزایش سطح آنزیم های پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، ترکیبات فنولی و لیگنینی شدن دیواره سلول گیاهی، سبب بازداری از عوامل بیماری زا گردند ( Jetiyanona and Kloepper 2002). نتایج نشان داده است که ترکیبی از ریزوباکترها سبب بازداری بهتر عامل ویروس موزاییک خیار (Cucumber mosaic virus, CMV) در خیار و ویروس برگ دسته ای موز ( Banana bunchy top virus, BBTV) در میزبان موز شده است ( Jetiyanona and Kloepper 2002, Harish et al. 2009). همچنین در گیاهان گوجه فرنگی تیمار شده با باکتری های *B. amyloliquefaciens* و *B. pumilus subtilis* در برابر آلودگی به ویروس پیسه ای گوجه فرنگی (Tomato mottle virus, ToMoV)، کاهش معنی داری در وقوع و شدت بیماری ناشی از این ویروس مشاهده گردیده است (Murphy et al. 2000). به طور کلی این احتمال وجود دارد که به کارگیری مخلوطی از جدایه های باکتری می تواند شرایطی را مانند شرایط طبیعی در ناحیه ریزوسفر برای گیاه القا نماید؛ بنابراین در کنترل زیستی عوامل بیماری زا موفقیت بیشتری را فراهم آورد (Mishra et al. 2014). به طور کلی به کارگیری باکتری های پروبیوتیک گیاهی اگرچه به طور کامل از بروز علائم و تکثیر ویروس های بیماری زا در گیاهان جلوگیری نمی کند، اما به طور چشمگیری سبب کاهش علائم در میزبان می شوند؛ بنابراین می توانند سبب کاهش میزان خسارت ناشی از ویروس ها در محصولات می شوند. نتایج این تحقیق نشان می دهد که استفاده از ترکیب مناسبی از ریزوباکترهای گیاهی دارای اثر هم افزایی بوده، می تواند در مدیریت تلفیقی بیماری ها جهت کنترل زیستی ویروس ها از اهمیت بسزایی برخوردار باشد.

هنگامی که مؤلفه های رشدی گیاه توسط عوامل پروبیوتیک افزایش می یابند، شدت آلودگی میزبان توسط عوامل ویروسی کاهش می یابد (Murphy et al. 2003). نتایج این پژوهش نیز نشان داد که به-کارگیری ترکیبی از ریزوباکترهای پروبیوتیک (*P. fluorescens putida* و *B. subtilis*)، سبب افزایش شاخص های رشد و همچنین کاهش تجمع و علائم ناشی از TMV در گیاه گوجه فرنگی رقم M16 شدند. همچنین نتایج این پژوهش مشخص نمود که ترکیبی از عوامل پروبیوتیک هنگامی که جهت کنترل زیستی TMV در گوجه فرنگی استفاده شوند، موفق تر از کاربرد هر یک از باکتری ها به صورت جداگانه است. یکی از دلایل احتمالی این است که افزایش شاخص های رشد در گیاهان با ریزوباکتری ها ممکن است که زمان لازم جهت ظهور علائم شدید ویروسی را کاهش دهند (Murphy et al. 2003). به طور کلی در مقایسه با کاربرد پروبیوتیک ها به تنهایی، ترکیبی از چندین جدایه از این جدایه های باکتری ها مختلف سبب پایداری بیشتر در ناحیه ریزوسفر گیاهان، به کارگیری چندین سازوکار جهت کنترل زیستی عوامل بیماری زا و بازداری از طیف وسیعی از بیمارگرها می شود (Pierson and Weller, 1994, Murphy et al. 2003, Kavino et al. 2007). بر اساس پژوهش های انجام گرفته، استفاده از چندین سازگار باقابلیت کنترل زیستی بیمارگر، سبب بازداری بیشتر عوامل بیماری زا می شوند (Janisiewicz 1988, Murphy et al. 2007, Kavino et al. 2007). در پژوهشی که توسط Raupach و Kloepper (1998) و به منظور استفاده از باکتری های پروبیوتیک گیاهی جهت القای مقاومت القایی انجام گرفت، نشان داده شد که مخلوطی از جدایه ها دارای اثر هم افزایی بوده و سبب بازداری بیشتر عوامل بیماری زا می گردد. ترکیب مخلوطی از عوامل پروبیوتیک ممکن است با ساز-

## REFERENCES

- Ab Rahman SFS, Singh E, Pieterse CM, Schenk PM (2018) Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science* 267(1): 102-111.
- Adams MJ, Adkins S, Bragard C, Gilmer D, Li D, MacFarlane SA, Consortium IR (2017) ICTV

- virus taxonomy profile: *Virgaviridae*. The Journal of General Virology 98(8): 1999.
- Agrios GN** (2005) Introduction to plant pathology. Elsevier Academic Press Publication.
- Balachandran S, Hurry V M, Kelley SE, Osmond CB, Robinson SA, Rohozinski J, Sims DA** (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 100(2): 203-213.
- Alishiri A, Rakhshandehroo F, Zamanizadeh H, Palukaitis P** (2013) Prevalence of *Tobacco mosaic virus* in Iran and evolutionary analyses of the coat protein gene. *Plant Pathology Journal* 29(3): 260-273.
- Balachandran S, Osmond CB, Daley PF** (1994) Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between *tobacco mosaic virus* and chloroplasts of tobacco leaves *in vivo* by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 104(3): 1059-1065.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T** (2007) Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 58(15-16): 4019-4026.
- Buttery BR, Buzzell RI** (1977) The relationship between chlorophyll content and rate of photosynthesis in soybeans. *Canadian Journal of Plant Science* 57(1): 1-5.
- Clark MF, Adams AN** (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34(3): 475-483.
- Croft H, Chen JM, Luo X, Bartlett P, Chen B, Staebler RM** (2017) Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology* 23(9): 3513-3524.
- Daley PF** (1995) Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17(2): 167-173.
- del Carmen Orozco-Mosqueda M, del Carmen Rocha-Granados M, Glick BR, Santoyo G** (2018) Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research* 208(1): 25-31.
- Guo DP, Guo YP, Zhao JP, Liu H, Peng Y, Wang QM, Rao GZ** (2005) Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Science* 168(1): 57-63.
- Guo P, Li M** (1996) Studies on photosynthetic characteristics in rice hybrid progenies and their parents I. chlorophyll content, chlorophyll-protein complex and chlorophyll fluorescence kinetics. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 4(4): 60-65.
- Harish S, Kavino M, Kumar N, Balasubramanian P, Samiyappan R** (2009) Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*. *Biological Control* 51(1): 16-25.
- Hull R** (1989) The movement of viruses in plants. *Annual Review of Phytopathology* 27(1): 213-240.
- Hull R** (2014) *Matthews' Plant Virology*. 5th ed. Academic Press, USA.
- Janisiewicz WJ** (1988) Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. *Phytopathology* 78(2): 194-198.
- Jetiyanon K, Kloepper JW** (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control* 24(3): 285-291.
- Kandan A, Ramiah M, Vasanthi VJ, Radjaccomare R, Nandakumar R, Ramanathan A, Samiyappan R** (2005) Use of *Pseudomonas fluorescens*-based formulations for management of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and enhanced yield in tomato. *Biocontrol Science and Technology* 15(6): 553-569.
- Kavino M, Harish S, Kumar N, Saravanakumar D, Damodaran T, Soorianathasundaram K, Samiyappan R** (2007) Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against *Bunchy top virus*. *Soil Biology and Biochemistry* 39(5): 1087-1098.
- Koch E, Becker JO, Berg G, Hauschild R, Jehle J, Kohl J, Smalla K** (2018) Biocontrol of plant diseases is not an unsafe technology. *Journal of Plant Diseases and Protection* 125(2): 121-125.
- Kura-Hotta M, Satoh K, Katoh S** (1987) Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 28(7): 1321-1329.
- Letschert B, Adam G, Lesemann DE, Willingmann P, Heinze C** (2002) Detection and differentiation of serologically cross-reacting *tobamoviruses* of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods* 106(1): 1-10.
- Lenin G, Jayanthi M** (2012) Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on

- enhancement of growth, yield and nutrient content of *Catharanthus roseus*. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology 2: 37-42.
- Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, Davis CE** (2015) Advanced methods of plant disease detection. A review. Agronomy for Sustainable Development 35(1): 1-25.
- Mishra S, Jagadeesh KS, Krishnaraj PU, Prem S** (2014) Biocontrol of *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) in tomato with chitosan supplemented formulations of *Pseudomonas* sp. under field conditions. Australian Journal of Crop Science 8(3): 347.
- Montasser MS, Dashti NH, Ali NY, Bhardwaj R, Al-Hamar B** (2006) Occurrence of three strains of *Cucumber mosaic virus affecting* tomato in Kuwait. Plant Pathology Journal 22(1): 51-62.
- Mujdeci M, Senol H, Cakmakci T, Celikok P** (2011) The effects of different soil water matric suctions on stomatal resistance. Journal of Food, Agriculture and Environment 9(1): 1027-1029.
- Murchie EH, Horton P** (1997) Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. Plant, Cell and Environment 20(4): 438-448.
- Murphy JF, Reddy MS, Ryu CM, Kloepper JW, Li R** (2003) Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against *Cucumber mosaic virus*. Phytopathology 93(1): 1301-1307.
- Murphy JF, Zehnder GW, Schuster DJ, Sikora EJ, Polston JE, Kloepper JW** (2000) Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. Plant Disease 84(7): 779-784.
- Peng S, Sanico AL, Garcia FV, Laza RC, Visperas RM, Descalsota JP, Cassman KG** (1999) Effect of leaf phosphorus and potassium concentration on chlorophyll meter reading in rice. Plant production science 2(4): 227-231.
- Pierson EA, Weller DM** (1994) To suppress take-all and improve the growth of wheat. Phytopathology 84(1): 940-947.
- Radwan DEM, Fayez KA, Mahmoud SY, Hamad A, Lu G** (2007) Physiological and metabolic changes of Cucurbita pepo leaves in response to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. Plant Physiology and Biochemistry 45(6-7): 480-489.
- Raupach GS, Kloepper JW** (1998) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology 88(11): 1158-1164.
- Roberts PL, Wood KR** (1982) Effects of a severe (P6) and a mild (W) strain of *Cucumber mosaic virus* on tobacco leaf chlorophyll, starch and cell ultrastructure. Physiological Plant Pathology 21(1): 31-37.
- Saini P, Khanna V, Gangwar M** (2015) Mechanisms of plant growth promotion by rhizobacteria. Journal of Pure and Applied Microbiology 9(1): 1163-1177.
- Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba JI, Sueda K, Masuta C** (2011) A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. PLOS pathogens 7(5): e1002021.
- Sims DA, Gamon JA** (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote sensing of environment 81(2-3): 337-354.
- Singh M, Singh D, Gupta A, Pandey KD, Singh PK, Kumar A** (2019) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* (pp. 41-66). Woodhead Publishing.
- Srinivasan K, Surendiran G, Maathivanan N** (2005) Pathological and molecular biological investigations on *sunflower necrosis virus* (SNV) and ISR mediated biological control of SNV by PGPR strains. In Asian Conference on Emerging Trends in Plant-Microbe Interaction 8(10).
- Vinayarani G, Madhusudhan KN, Deepak SA, Niranjana SR, Prakash HS** (2011) Detection of mixed infection of tobamoviruses in tomato and bell pepper by using RT-PCR and duplex RT-PCR. International Journal of Plant Pathology 2(2): 89-95.
- Yuan Y** (2011) Multiple imputation using SAS software. Journal of Statistical Software 45(6): 1-25.
- Zehnder GW, Yao C, Murphy JF, Sikora ER, Kloepper JW** (2000) Induction of resistance in tomato against *Cucumber mosaic cucumovirus* by plant growth-promoting rhizobacteria. Biocontrol 45(1): 127-137.