اثر برخی ترکیبات فرار القاءکننده مقاومت بر کنترل بیماری برق‌زدگی نخود

ناهید معرف‌زاده [1*]، هادی خاطری [1] و روح‌اله شریفی [1]

۱- *نویسنده مسوول: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
(n.moarrefzadeh@razi.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۷

چکیده

بیماری برق‌زدگی نخود با عامل قارچی *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید نخود در بیش‌تر مناطق جهان است. در این پژوهش اثر شش ترکیب فرار القاءکننده مقاومت، شامل متیل‌سالیسیلات، ۲،۳- بوتان‌دی‌اُل، متیل‌جاسمونات، استوئین، ایندول و ۳-پنتانول، در مقایسه با قارچ‌کش کلروتالونیل بر رشد بیمارگر در آزمایشگاه و مهار بیماری برق‌زدگی و صفات رشدی نخود در گلخانه بررسی شد. کلیه ترکیبات فرار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار از رشد میسلیومی بیمارگر *A. rabiei* جلوگیری نمودند و بیش‌ترین و کم‌ترین اثر بازدارندگی به مقدار ٦٤/٩ و ٤/٧ درصد به ترتیب مربوط به ۳-پنتانول و متیل‌جاسمونات بود. در گلخانه، این ترکیبات فرار به‌جز متیل‌جاسمونات، سبب کاهش شدت بیماری برق‌زدگی نسبت به شاهد بیمار شدند. بیش‌ترین کاهش شدت بیماری مربوط به تیمار کلروتالونیل (٨٦ درصد) و متیل‌سالیسیلات (٥٥/٨ درصد) بود. بیش‌تر ترکیبات فرار در گیاهان آلوده‌شده به بیمارگر، سبب افزایش وزن تَر و خشک ریشه و وزن تَر و خشک اندام هوایی نسبت به شاهد آلوده شدند. اثر متیل‌سالیسیلات بر افزایش وزن تَر اندام هوایی و اثر ایندول در افزایش وزن تَر و خشک ریشه و وزن خشک اندام هوایی نسبت به شاهد آلوده بیش از سایر تیمارها بود. متیل‌جاسمونات در مقایسه با سایر ترکیبات فرار کم‌ترین اثر را بر افزایش صفات رشدی مورد بررسی داشت. استفاده از ترکیبات فرار می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد جدید و نویدبخش جهت مدیریت تلفیقی بیماری برق‌زدگی نخود و تحریک رشد این گیاه در نظر گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: Ascochyta rabiei، القای مقاومت، تحریک رشد

دبیر تخصصی: دکتر مهدی مهرابی کوشکی

مقدمه

گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهم‌ترین حبوبات است که در جهان پس از لوبیا و نخودفرنگی رتبه سوم تولید را به خود اختصاص داده است و در بیش از ۵۰ کشور جهان به ویژه در کشورهای آسیایی و آفریقایی کشت و مصرف می‌شود (Tadesse et al., 2017; Baite and Dubey, 2018; Ahmad et al., 2021). علی‌رغم وسعت زیاد اراضی زیر کشت نخود، تولید کل و عملکرد آن در اکثر کشورهای کشت دهنده بسیار کم است و یکی از دلایل اصلی این موضوع، بیماری‌های گیاهی هستند (Sharma et al., 2010). تاکنون بیش از ۱۷۲ بیمارگر گیاهی از نخود گزارش شده که در میان آن‌ها برق‌زدگی به دلیل پراکنش وسیع و قدرت تخریبی بالا، یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید نخود در بیش‌تر مناطق دنیاست (Nene et al., 2012). عامل بیماری برق‌زدگی نخود قارچی نکروتروف به نام *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. است (Nizam et al., 2010) که می‌تواند در تمام مراحل رشد محصول، تمامی بخش‌های هوایی گیاه را مورد تهاجم قرار داده (Benzohra et al., 2012) و سبب کاهش شدید عملکرد و کیفیت دانه شود. در ارقام حساس نخود خسارت این بیماری تا ۱۰۰ درصد نیز می‌رسد (Benzohra et al., 2020). در مناطقی که در طول فصل رشد نخود، شرایط محیطی خنک و مرطوب باشد، این بیماری شدیدتر است (Parida et al., 2020). در گیاه بیمار، لکه‌های قهوه‌ای تیره تا سیاه با اندازه‌های متغیر روی غلاف‌ها، دانه‌ها، شاخساره‌ها، برگچه‌ها و ساقه ظاهر می‌شود (Javaid et al., 2020) و اگر در ساقه اصلی پوسیدگی در ناحیه طوقه احاطه شود، کل گیاه از بین می‌رود (Nene, 2008). در ایران نیز این بیماری در برخی استان‌ها نظیر کرمانشاه، لرستان، ایلام، گلستان و فارس خسارت بالایی به محصول نخود وارد می‌سازد (Vafaei et al., 2017).

مدیریت تلفیقی به‌عنوان بهترین راهبرد برای کاهش خسارت ناشی از برق‌زدگی نخود شناخته شده است (Gan et al., 2006). در این راهبرد از روش‌های مختلفی مانند کاربرد بذرهای عاری از عامل بیماری، انهدام یا اجتناب از منابع حاوی مایه قارچ (Davidson and Kimber, 2007)، روش‌های زراعی مانند تناوب (Manjunatha et al., 2018)، ارقام مقاوم (Owati et al., 2017)، تنظیم تاریخ کاشت (Ben Mohamed et al., 2010) و استفاده از مواد شیمیایی به صورت تیمار بذرها یا محلول‌پاشی اندام‌های هوایی (Ennouri et al., 2020) استفاده می‌شود. کنترل زیستی توسط عوامل همستیز و میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه[1] (PGPM) نیز می‌تواند به‌عنوان یکی از مؤلفه‌های اصلی در مدیریت تلفیقی *A. rabiei* به شمار آید (Benzohra et al., 2013; Manjunatha et al., 2018). میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست برای مهار بیمارگرهای گیاهی و حفاظت از گیاه در برابر خسارت این عوامل، از سازوکارها و روش‌های مختلفی استفاده می‌کنند، که یکی از آن‌ها تولید ترکیبات آلی فرار[2] (VOCs) است (Bhattacharyya and Jha, 2012).

ترکیبات فرار ترکیباتی با وزن مولکولی کم (کم‌تر از ۳۰۰ دالتون)، اکثراً آب‌گریز (Ali et al., 2015)، دارای نقطه‌جوش کم و فشار بخار بالا هستند (Schulz and Dickschat, 2007). این ترکیبات محصولات متابولیسم ثانویه در موجودات زنده از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند که به‌سرعت تبخیر شده و در زیستگاه‌های طبیعی پراکنده می‌شوند (Dhakshinamoorthy et al., 2020). تاکنون صدها ترکیب آلی فرار مختلف میکروبی متعلق به گروه‌های شیمیایی متعدد شامل آلکان‌ها، آلکن‌ها، الکل‌ها، استرها، کتون‌ها، ترکیبات گوگردی، ترپنوئیدها و غیره شناسایی شده‌اند (Raza and Shen, 2020). ترکیبات فرار قادرند از طریق منافذ پر از آب و گاز در خاک و ریزوسفر انتشار یافته و نقش مهم و چندگانه‌ای در تعامل گیاه-میکروب داشته باشند (Yuan et al., 2017). این ترکیبات به عنوان زبان شیمیایی برای تعامل بین موجودات زنده در سطح بین و درون گونه‌ای و گاهی بین سلسله‌ای عمل می‌کنند (Bailly et al.,

1- Plant growth-promoting microorganisms
2- Volatile organic compounds

2014; Piechulla et al., 2017; Sharifi and Ryu, 2018). این ترکیبات توانایی خوبی برای کنترل قارچ‌ها (Yuan et al., 2012; Faheem et al., 2015)، باکتری‌ها (Tahir et al., 2017a) و نماتدهای بیماری‌زای گیاهی (Gu et al., 2007) دارند. بنابراین، می‌توانند از آلودگی گیاه به عوامل بیماری‌زای گیاهی ممانعت کنند (Veselova et al., 2019) و یکی از سازوکارهای مهم به‌کار رفته توسط PGPM برای کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی باشند (Ossowicki et al., 2017). مشارکت ترکیبات فرار در ایجاد پدیده قارچ‌ایستایی و بازدارندگی خاک ثابت شده است (Zou et al., 2007; Garbeva et al., 2011).

ترکیبات فرار آلی همچنین به‌عنوان الیسیتورهای دفاع گیاه عمل نموده (Dhakshinamoorthy et al., 2020) و باعث القای مقاومت سیستمیک و تحمل گیاهان در برابر تنش‌های زیستی (Veselova et al., 2019) و غیرزیستی می‌شوند (Ali et al., 2015; Kalyanasundaram et al., 2021). از این گذشته، برخی از ترکیبات آلی فرار ناشی از PGPM می‌توانند رشد گیاهان میزبان خود را افزایش دهند (Ryu et al., 2003). بنابراین ترکیبات آلی فرار میکروبی می‌توانند به‌عنوان محرک رشد یا محافظ گیاه در برابر تنش‌های زیستی یا غیرزیستی و یا به هر دو شکل عمل کنند (Raza and Shen, 2020) و به‌عنوان یک راهبرد پایدار برای تقویت و محافظت از محصولات، مورد بهره‌برداری قرار گیرند (Li et al., 2020). با این وجود، تولید ترکیبات آلی فرار توسط میکروارگانیسم‌ها تحت تأثیر گونه میکروبی، مرحله رشد و شرایط محیطی مانند مواد غذایی، pH، رطوبت و دما قرار دارد (Larsen and Frisvad, 1994; Batterman, 1995; Whillans and Lamont, 1995). یکی از راهبردهای موجود برای حل این مسأله می‌تواند کاربرد ترکیبات زیست‌فعال این میکروارگانیسم‌ها، به‌جای فرمولاسیون زنده آن‌ها باشد (Ali et al., 2015; Tyc et al., 2017). ترکیبات فرار خالص نتایج امیدوار کننده‌ای در بهبود رشد گیاه و مهار آفات و بیماری‌های مزرعه‌ای نشان داده‌اند (Song and Ryu, 2013; Choi et al., 2014; Wang et al., 2019). با وجود مزایای متعدد این ترکیبات تاکنون پژوهشی در زمینه استفاده از آن‌ها در مهار برق‌زدگی نخود انجام نشده است. بنابراین در پژوهش حاضر، قابلیت مهار کنندگی برخی ترکیبات فرار شیمیایی بر مهار این بیمارگر در آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی گردید. همچنین اثر این ترکیبات روی برخی صفات رشدی نخود در حضور این بیمارگر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه بیمارگر

یک جدایه از قارچ *A. rabiei* از کلکسیون قارچ‌های بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی تهیه گردید. این جدایه پیش‌تر بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی شناسایی شده و بیماری‌زایی آن روی نخود به اثبات رسیده بود (Seydi, 2014). جدایه مذکور در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت جامد آرد نخود – دکستروز – آگار[1] (CDA) که حاوی ۴۰ گرم آرد دانه نخود، ۲۰ گرم دکستروز و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سترون است، کشت گردید و در دمای ۲۰–۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Benzohra et al., 2013; Farahani et al., 2019).

تهیه ترکیبات فرار و آماده‌سازی غلظت مناسب آن‌ها

جهت انجام این پژوهش از ترکیبات فرار خریداری شده از شرکت سیگما آلدریچ که دارای خلوص بالای ۹۸ درصد بودند، استفاده گردید. این ترکیبات شامل متیل‌سالیسیلات، ۲،۳– بوتان‌دی‌اُل، متیل‌جاسمونات، استوئین (۳–هیدروکسی–۲–بوتانون)، ایندول و ۳–پنتانول بودند که پس از تهیه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت ۱۰۰ میکرومولار از هر کدام از ترکیبات فرار به همراه امولسیون کننده توئین ۲۰ به غلظت ۰/۲ درصد در آب مقطر سترون تهیه شده و جهت انجام بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به‌کار رفت.

1- Chickpea seed meal dextrose agar

اثر بازدارندگی ترکیبات فرار بر رشد بیمارگر *Ascochyta rabiei* در آزمایشگاه

آزمون فعالیت ضدقارچی ترکیبات فرار

این آزمون با استفاده از تشتک‌های پتری با قطر نُه سانتی‌متر روی محیط کشت CDA انجام شد. یک قرص پنج میلی‌متری از کشت قارچ بیمارگر روی سطح محیط CDA قرار داده شد. تشتک‌های پتری به‌صورت وارونه قرار داده شدند و در قسمت داخلی درب پتری میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی غلظت ۱۰۰ میکرومولار ترکیبات فرار ریخته شد. تشتک‌های پتری به همان حالت وارونه (به شکلی که درب پتری در قسمت تحتانی قرار گیرد) نگهداری شدند تا از ریزش ترکیبات بر روی محیط کشت حاوی قارچ جلوگیری شود. در تشتک‌های پتری شاهد به‌جای محلول حاوی ترکیبات فرار از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌های پتری به‌خوبی توسط پارافیلم مسدود شده و در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از دو هفته که بیمارگر در تشتک شاهد تا نزدیک حاشیه تشتک پیشروی کرده بود، نتایج ثبت شدند. میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر با فرمول $IR\ (\%) = \frac{(C-B)}{C} \times 100$ محاسبه شد (Huang et al., 2017) که در آن IR درصد بازدارندگی، C قطر کلنی قارچ در تشتک شاهد و B قطر کلنی قارچ در هر یک از تشتک‌های پتری دارای تیمار ترکیبات فرار است.

در مورد هر کدام از ترکیبات فرار، آزمون فوق در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های حاصل با رویه تجزیه واریانس در نرم‌افزار SAS (نسخه ۹,۳) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال آماری پنج درصد صورت گرفت.

اثر ترکیبات فرار روی شدت بیماری برق‌زدگی و صفات رشدی نخود در شرایط گلخانه

تکثیر مایه قارچ *Ascochyta rabiei*

قارچ بیماری‌زای *A. rabiei*، روی چند تشتک پتری حاوی محیط CDA کشت داده شد. سپس تشتک‌ها به مدت چهار هفته تا زمان تشکیل پیکنیدیوم در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. به‌منظور جدا کردن پیکنیدهای حاوی کنیدی، محیط‌های حاوی قارچ توسط آب مقطر سترون غرقاب و پس از یک ساعت به‌آرامی با یک اسکالپل سترون خراشیده شدند. سپس از لام گلبول‌شمار[1] جهت تنظیم غلظت سوسپانسیون کنیدیوم‌ها به میزان ۲×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد.

کاربرد ترکیبات فرار جهت بررسی اثر آن‌ها در کنترل *A. rabiei* در شرایط گلخانه

در گلخانه به‌منظور بررسی اثر ترکیبات فرار تجاری بر بیمارگر *A. rabiei* و تأثیر آن‌ها بر صفات رشدی نخود، آزمایشی گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با نُه تیمار و پنج تکرار انجام شد. تیمارهای اعمال‌شده در این پژوهش در جدول ۱ بیان شده‌اند. جهت تهیه بستر رشد گیاه از ترکیب پرلیت و پیت‌ماس سترون به نسبت ۳ به ۱ استفاده شد. این ترکیب به گلدان‌های پلاستیکی ۴۰۰ میلی‌لیتری که قطر دهانه آن‌ها هشت و ارتفاع آن‌ها ۱۳ سانتی‌متر بود، انتقال یافت. در این آزمایش از بذور نخود رقم بیونیج که از ارقام حساس به این بیمارگر هست، استفاده شد. ضدعفونی سطحی بذور توسط الکل ۷۰ درصد و سپس هیپوکلریت سدیم نیم درصد، هر کدام به مدت یک دقیقه انجام شد. سپس بذور چند بار توسط آب مقطر شستشو داده شدند و برای جوانه‌زنی، به مدت دو روز در ظروف شیشه‌ای سترون و لایه نازکی از آب مقطر در دمای اتاق قرار گرفتند. هنگام کاشت بذور، بیش از سه‌چهارم حجم گلدان‌ها با ترکیب پیت‌ماس و پرلیت پر شد و در هر گلدان سه عدد بذر نخود جوانه‌زده قرار داده و روی بذور با لایه‌ای از پیت‌ماس و پرلیت سترون پوشانده شد. پس از اطمینان از استقرار گیاهچه‌ها، یک گیاهچه از هر گلدان حذف شد. ۱۲ روز پس از کاشت بذور نخود و ۴۸ ساعت قبل از مایه‌زنی بیمارگر، ترکیبات فرار که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تهیه شده بودند، به صورت محلول‌پاشی به برگ‌های نخود

1- Hemacytometer

پاشش گردیدند و تیمارهای مختلف در جعبه‌های پلاستیکی شفاف به صورت جداگانه قرار گرفتند. سپس سطح جعبه‌ها با نایلون شفاف (سلوفان) مسدود شد تا اثرشان به دلیل ماهیت فرار آن‌ها با هم تداخل ننماید. یکی از تیمارهای این آزمایش قارچ‌کش کلروتالونیل بود که هم‌زمان با ترکیبات فرار به غلظت یک در هزار تهیه شده و به صورت محلول‌پاشی برگ‌های نخود استفاده گردید. در گلدان‌های شاهد سالم محلول‌پاشی به‌جای ترکیبات فرار، با آب مقطر حاوی توئین ۲۰ صورت گرفت. دو روز بعد، یعنی ۱۴ روز پس از کاشت بذور، در تیمارهای مختلف (به استثنای شاهد سالم) توسط افشانه‌های دستی مه‌پاشی سوسپانسیون بیمارگر حاوی ۲×۱۰^{۴} کنیدی در میلی‌لیتر آب به‌طور یکنواخت به سطح گیاهچه‌های نخود و تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ، انجام شد. روی تیمار شاهد سالم نیز فقط آب پاشیده شد. سپس سطح گیاهان مایه‌زنی شده به‌منظور حفظ رطوبت، به مدت ۷۲ ساعت توسط نایلون شفاف پوشانده شد (Liu et al., 2016). گیاهان تلقیح شده در شرایط گلخانه به‌صورت کاملاً تصادفی در دمای ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آبیاری گیاهان نیز به صورت روزانه و با جریان ملایم آب حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام کود کامل (NPK+TE, 18-18-18 با نام تجاری Fermolife، تهیه شده از شرکت بهاران اصفهان) انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص بیماری و فاکتورهای رشدی

دو هفته پس از تلقیح بیمارگر و تقریباً هفت روز پس از ظهور نشانه‌های آشکار بیماری روی شاهد بیمار، شدت بیماری برق‌زدگی در تیمارهای مختلف توسط مقیاس درجه‌بندی ۱-۹ به‌صورت زیر تعیین شد: ۱) گیاه سالم و فاقد بیماری است. ۲) لکه‌های بیماری موجود می‌باشند، اما کوچک و غیرقابل مشاهده‌اند. ۳) لکه‌ها به‌آسانی مشاهده می‌شوند، اما گیاه عمدتاً سبز است. ۴) لکه‌های شدید به‌وضوح قابل‌مشاهده‌اند. ۵) لکه‌ها روی اکثر برگ‌ها دیده می‌شوند و ساقه‌ها را احاطه می‌کنند. ۶) گیاه در حال زوال است، نوک‌های گیاه دچار سرخشکیدگی می‌شوند. ۷) گیاه در حال مرگ است، اما حداقل سه برگ سبز وجود دارد. ۸) گیاه تقریباً مرده و هیچ برگ سبزی باقی نمانده، اما هنوز دارای ساقه سبز است. ۹) گیاه مرده و تقریباً هیچ قسمت سبزی قابل‌مشاهده نیست (Chen et al., 2004).

پس از ارزیابی شاخص بیماری، گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف به‌آرامی از گلدان خارج شدند و پس از شستشوی کامل ریشه، شاخص‌های رشدی بوته‌ها شامل وزن تر و خشک اندام هوایی و نیز وزن تر و خشک ریشه اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SAS و در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد و در کلیه محاسبات، سطح احتمال آماری پنج درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

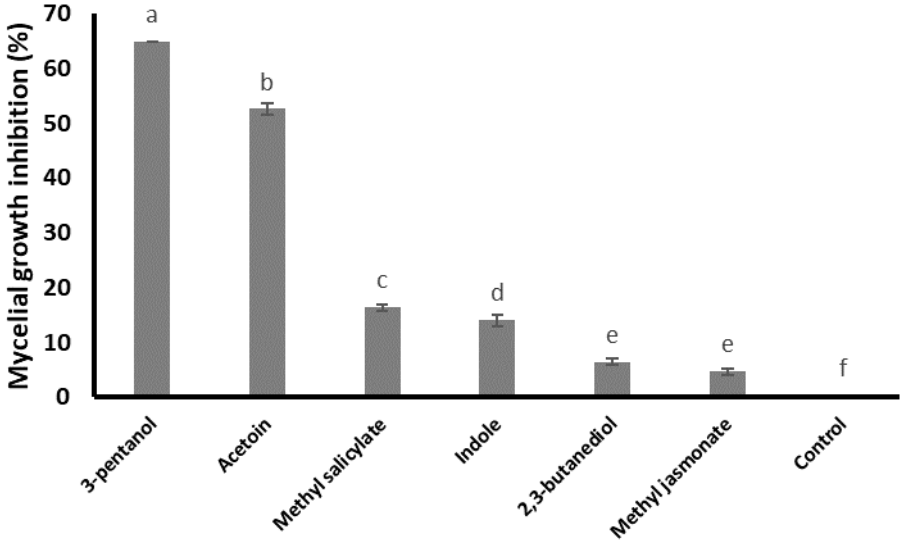
اثر ترکیبات فرار در مهار رشد میسلیومی بیمارگر *A. rabiei* در شرایط آزمایشگاه

کلیه ترکیبات فرار توانستند با اختلاف معنی‌دار از شاهد، از رشد میسلیوم بیمارگر *A. rabiei* جلوگیری نمایند. بین میزان بازدارندگی ترکیبات فرار اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. بیش‌ترین میزان ممانعت از رشد بیمارگر به ترتیب مربوط به ترکیبات ۳-پنتانول و استوئین با ۶۴/۹۱ و ۵۲/۶۳ درصد و کم‌ترین اثر مربوط به متیل‌جاسمونات با ۴/۶۷ درصد بازدارندگی بود (شکل ۱).

اثر ترکیبات فرار بر مهار بیمارگر *A. rabiei* در شرایط گلخانه

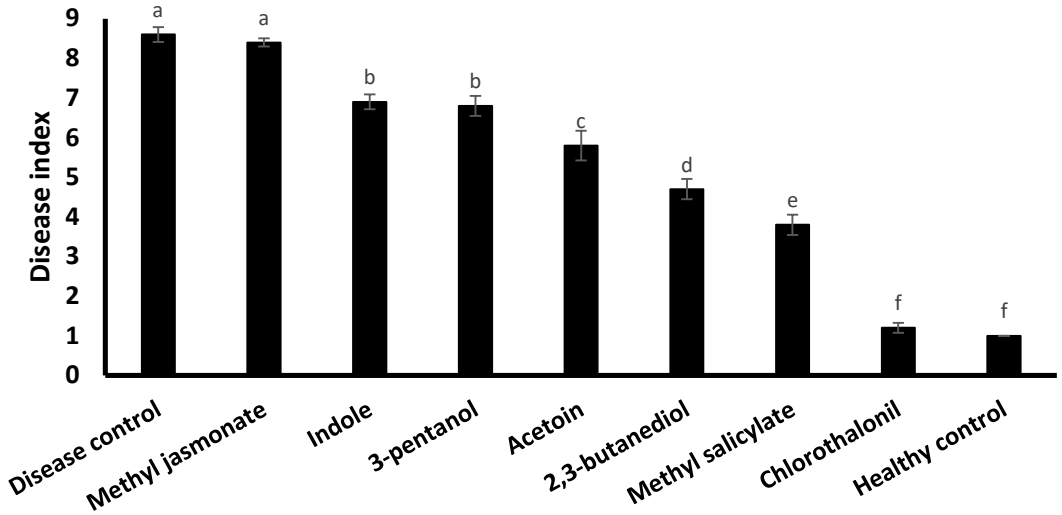
نتایج تیمار ترکیبات فرار و کلروتالونیل در شرایط گلخانه نشان داد که قارچ‌کش مذکور و همه ترکیبات فرار استفاده شده به جز متیل‌جاسمونات، توانسته بودند نسبت به شاهد بیمار، در سطح احتمال پنج درصد سبب کاهش شدت بیماری برق‌زدگی نخود شوند، هرچند که بین میزان اثرشان در مهار بیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۲). بیش‌ترین میزان بازدارندگی از بیماری پس از قارچ‌کش کلروتالونیل که سبب ۸۶/۰۴ درصد مهار بیماری گردید، مربوط به متیل‌سالیسیلات و

۲،۳- بوتان‌دی‌اُل بود که به ترتیب سبب کاهش ۵۵/۸۱ و ۴۵/۳۴ درصدی شدت بیماری نسبت به شاهد بیمار شدند. پس از آن‌ها استوئین، ۳-پنتانول و ایندول به ترتیب با ۳۲/۵۵ ، ۲۰/۹۳ و ۱۹/۷۶ درصد کاهش بیماری، در درجات بعدی اثر علیه *A. rabiei* قرار داشتند (شکل ۲).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر ترکیبات فرار بر رشد میسلیومی قارچ بیمارگر *Ascochyta rabiei* روی محیط CDA در شرایط آزمایشگاه. میانگین‌های دارای حروف مشترک، از نظر آماری در سطح احتمال پنج درصد با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 1. Mean comparison of the effect of volatile compounds on mycelial growth of *Ascochyta rabiei* in CDA medium *in vitro*. Means with common letters are not statistically significant at the 5% probability level.



شکل ۲- اثر ترکیبات فرار بر شاخص بیماری ناشی از بیمارگر *Ascochyta rabiei* در گلخانه. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. میانگین‌های دارای حروف مشترک، از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 2. The effect of treatment of volatile compounds on the disease index caused by the pathogenic fungus *Ascochyta rabiei* in the greenhouse. The means were compared using Duncan's test at the level of 5% probability. Means with common letters are not statistically significant.

اثر ترکیبات فرار بر شاخص‌های رشدی نخود در حضور بیمارگر *A. rabiei* در شرایط گلخانه

استفاده از ترکیبات فرار در حضور بیمارگر، سبب افزایش وزن تر و خشک ریشه و وزن تر و خشک اندام هوایی در برخی تیمارها نسبت به شاهد بیمار گردید (جدول ۱). متیل‌سالیسیلات و متیل‌جاسمونات به ترتیب با افزایش ۱۳۶ و ۱۶ درصدی وزن تر اندام هوایی نسبت به شاهد آلوده، بیش‌ترین و کم‌ترین اثر را بر این شاخص رشدی داشتند. همچنین ایندول و متیل‌جاسمونات به ترتیب با افزایش ۲۰۵ و ۱۴۹ درصدی وزن تر ریشه نسبت به شاهد بیمار، در بهبود این صفت رشدی قوی‌تر و ضعیف‌تر از کلیه تیمارها عمل نمودند. بیش‌ترین و کم‌ترین تأثیر در افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشه نیز به ترتیب به ایندول و متیل‌جاسمونات تعلق داشت که سبب افزایش ۱۳۳ و ۱۷ درصدی این شاخص نسبت به شاهد بیمار گردیدند (جدول ۱). همچنین به استثنای ۳-پنتانول و متیل‌جاسمونات، تیمار چهار ترکیب فرار دیگر در حضور بیمارگر سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی نسبت به شاهد آلوده گردید و در میان این تیمارها ایندول با افزایش ۳۹ درصدی این شاخص نسبت به شاهد بیمار، اثر بهتری داشت. لازم به ذکر است که بین کارایی ترکیبات فرار در افزایش کلیه شاخص‌های رشدی بررسی شده اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۱).

بحث

کشاورزی نوین به فراورده‌های جدیدی نیاز دارد که امکان تولید و توسعه پایدار محصول را با توجه به نیاز کشاورزان و مصرف‌کنندگان فراهم کند. بنابراین، در دهه گذشته، برای محافظت پایدار از محصولات، گزینه‌های سازگار با محیط‌زیست مانند ترکیبات آلی فرار انتشار یافته توسط PGPM که توانایی کنترل بیماری‌های گیاهی، فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی و نیز تحریک رشد گیاه را دارند، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اما وابستگی میکروارگانیزم‌های تولید کننده این ترکیبات به عوامل مختلفی نظیر شرایط محیطی و گونه میکروبی تولید کننده و احتمال استقرار ناموفق این عوامل در محیط بکار رفته، سبب شده امروزه توسعه و کاربرد ترکیبات زیست‌فعال این عوامل، به‌جای فرمولاسیون زنده آن‌ها مورد توجه قرار گیرد.

در این پژوهش، ترکیبات فرار در آزمایشگاه از رشد میسلیوم بیمارگر *A. rabiei* جلوگیری نمودند، که نشان‌دهنده قابلیت قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی این ترکیبات علیه *A. rabiei* است. اثر ترکیبات فراری مانند

جدول ۱- اثر ترکیبات فرار بر صفات رشدی نخود در حضور قارچ بیمارگر *A. rabiei* در گلخانه.

Table 1. Effect of volatile compounds treatment on growth parameters of chickpea in the presence of *A. rabiei* in the greenhouse.

Treatment	Shoot wet weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root wet weight (g)	Root dry weight (g)
2,3-butanediol	3.02 e	0.44 dc	2.3 bcd	0.11 bc
3-pentanol	2.23 f	0.34 f	2.27 cde	0.12 b
Acetoin	3.24 d	0.4 e	2.25 cde	0.12 b
Chlorothalonil	4.28 b	0.47 b	2.49 ab	0.13 a
Disease control	1.65 h	0.33 f	0.83 f	0.06 e
Healthy control	4.61 a	0.53 a	2.46 abc	0.13 a
Indole	3.23 d	0.46 bc	2.53 a	0.14 a
Methyl jasmonate	1.92 g	0.35 f	2.07 e	0.07 d
Methyl salicylate		3.89 c	0.11 c	0.42 de

Data are means of 5 replicates. Different characters beside each column indicate statistically significant difference at 5% probability level according to Duncan test.

۱-اُکتن -۳- اُل[1] ، بنزوتیازول[2] و سیترونلول[3] در مهار رشد میسلیومی برخی بیمارگرهای اندام‌های هوایی (از جمله *Botrytis cinerea*، *Colletotrichum capsici*، *Alternaria brassicae*) ثابت شده است (Zhao et al., 2011). اثر بازدارندگی ایندول، ۳،۲-بوتان‌دی‌اُل و استوئین بر رشد میسلیومی بیمارگر پاخوره گندم (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) در پژوهش دیگری مشاهده گردیده اما برخلاف پژوهش حاضر، متیل‌سالیسیلات و متیل‌جاسمونات فاقد اثر بوده‌اند (Safari et al., 2020). از آن‌جا که مکان‌های اثر ترکیبات فرار در قارچ‌ها ممکن است متفاوت باشد و یا قارچ‌های مختلف قابلیت‌های متفاوتی برای سم‌زدایی متابولیت‌های فرار داشته باشند، اثرات بازدارندگی یکسانی نسبت به همه قارچ‌ها نشان نمی‌دهند (Kai et al., 2009).

در این پژوهش، قارچ‌کش حفاظتی کلروتالونیل در میان کلیه تیمارهای اعمال شده در گلخانه، بهترین اثر را در کاهش شدت بیماری برق‌زدگی داشت. کلروتالونیل از پرکاربردترین قارچ‌کش‌ها در کنترل برق‌زدگی است (Davidson and Kimber, 2007) که نحوه عملکرد آن واکنش با گروه‌های تیول در سیستم‌های آنزیمی بیمارگر است (Chang et al., 2007) و با مهار کارآمد بیمارگر، سبب افزایش عملکرد و کیفیت دانه نخود می‌شود (Chongo et al., 2003). در این تحقیق همه ترکیبات فرار (به‌جز متیل‌جاسمونات)، سبب کاهش شدت بیماری برق‌زدگی نسبت به شاهد بیمار شدند. اثر بازدارندگی ترکیبات فرار روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاه در بسیاری از مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال، مصرف ۱۰۰ میکرومولار استوئین، ایندول، ۳،۲-بوتان‌دی‌اُل، متیل‌سالیسیلات و متیل‌جاسمونات باعث کاهش معنی‌دار بیماری پاخوره گندم در گلخانه شده است (Safari et al., 2020). کاربرد غلظت ۱۰۰ میکرومولار ۲-هیدروکسی-۳-پنتانون (2-hydroxy-3-pentanone) از رشد *Botrytis cinerea* در آرابیدوپسیس ممانعت نموده است (Sharifi et al., 2013). استفاده از بنزوتیادیازول، ۳،۲-بوتان‌دی‌اُل و PC1 (یک مخلوط مبتنی بر ایزوپارافین) روی گیاهچه‌های *Nicotiana benthamiana* در گلخانه، تعداد زخم‌های ناشی از قارچ نکروتروف *Colletotrichum orbiculare* را در سطح برگ، بیش از ۷۰ درصد کاهش داده است (Cortes-Barco et al., 2010). کاربرد دو میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۳،۲-بوتان‌دی‌اُل در خاک گیاهچه‌های ذرت، باعث کاهش سه برابری ناحیه نکروزه ناشی از بیمارگر Setosphaeria turcica شده است (Chung et al., 2016). ترکیبات فرار به دلایل متعددی موجب کاهش بیماری می‌شوند؛ آن‌ها می‌توانند مانند آنتی‌بیوتیک عمل نموده و به‌طور مستقیم از رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپور بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی جلوگیری کنند (Kai et al., 2006; Vespermann et al., 2007)، باعث کاهش کارایی اتصال میسلیوم به سطح برگ میزبان شوند (Sharifi and Ryu, 2016)، با تاثیر قارچ‌ایستایی[4] (El-Hasan et al., 2007) به‌عنوان اولین بخش از سازوکار مقاومت، سرعت پیشرفت بیمارگر در گیاه را تا زمانی که اقدامات حفاظت از گیاه فعال شود، کاهش دهند (Kim and Anderson, 2020) و یا باعث القای مقاومت سیستمیک در گیاه شوند (Huang et al., 2012).

در تحقیق حاضر، متیل‌سالیسیلات و ۳،۲-بوتان‌دی‌اُل نسبت به سایر ترکیبات فرار بررسی شده، اثر بهتری در کاهش شاخص بیماری در گلخانه داشتند. با توجه به اینکه این ترکیبات در آزمایشگاه نسبت به ۳-پنتانول و استوئین اثر ضعیف‌تری در مهار رشد میسلیوم بیمارگر نشان دادند، احتمال دارد سازوکار اصلی آن‌ها در مهار بیمارگر در گلخانه، القای مقاومت سیستمیک به این

1- 1-Octen-3-ol
2- Benzothiazole
3- Citronellol
4- Fungistasis

بیمارگر در گیاه باشد. برخی محققین دیگر نیز گزارش نموده‌اند که سازوکار اصلی ترکیبات فرار میکروبی در مهار بیماری و محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا، القای مقاومت سیستمیک است نه مهار مستقیم بیمارگرها (Sharifi and Ryu, 2016). در مطالعات تعیین نمایه شیمیایی و عملکردی بیش از ۳۲ متابولیت فرار توسط GC-MS و NMR-MS، نیز ۳،۲-بوتان‌دی‌اُل به‌عنوان عامل اصلی القای مقاومت سیستمیک شناخته شده است (Farag et al., 2006; Han et al., 2006). مولکول‌های پیام‌رسان کوچک شامل هورمون‌های گیاهی اسید سالیسیلیک (SA)، اسید جاسمونیک (JA) و اتیلن (ET) هستند (Pieterse et al., 2009) که پاسخ دفاعی سلول‌های گیاهی برای ایجاد ایمنی در گیاه را حاصل می‌کنند (Farag et al., 2013). ترکیبات فرار آزاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها توانایی القای مقاومت سیستمیک را از طریق فعال‌سازی حداقل یکی از این مسیرهای سیگنال‌رسان دارند (Fincheira and Quiroz, 2018).

در پژوهش حاضر بیش‌تر ترکیبات فرار علیرغم حضور بیمارگر، سبب افزایش شاخص‌های رشدی نسبت به شاهد آلوده شدند. در بسیاری از تحقیقات، اثر ترکیبات فرار در افزایش رشد گیاه گزارش شده است (Ryu et al., 2004; Rudrappa et al., 2010). کاربرد ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم ۳،۲-بوتان‌دی‌اُل، باعث افزایش سطح برگ آرابیدوپسیس شده است (Ryu et al., 2003). ایندول در غلظت‌های پایین، باعث القای رشد آرابیدوپسیس گردیده (Bailly et al., 2014; Bhattacharyya et al., 2015) و ۳-پنتانول، هنگامی‌که در شرایط مزرعه اعمال شده، علاوه بر القای ایمنی سیستمیک در برابر *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*، باعث افزایش عملکرد میوه خیار شده است (Song and Ryu, 2013). ترکیبات فرار میکروبی با روش‌های مختلف رشد و سلامت گیاه را بهبود می‌بخشند؛ آن‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم از طریق ISR یا به‌طور غیرمستقیم به‌واسطه سرکوب بیمارگرهای گیاهی (کنترل بیولوژیک) رشد گیاه را تقویت کنند (Lee et al., 2012; Santoro et al., 2015; Sharifi and Ryu, 2018)، با کنترل سیگنال‌رسانی قند/ اسید آبسیزیک که منجر به افزایش مقدار کلروفیل و کارایی فتوسنتز می‌شود، سبب افزایش فتوسنتز و تجمع کربوهیدرات در گیاه شوند (Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2009; Farag et al., 2013; Castulo-Rubio et al., 2015)، مسیرهای سیگنال‌رسانی هورمونی گیاه را برای بهبود رشد و عملکرد و سلامت گیاه تعدیل و تنظیم کنند (Ryu et al., 2004; Tahir et al., 2017b)، به‌عنوان منبع مواد غذایی برای گیاهان عمل کنند (Ryu et al., 2003; Meldau et al., 2013) و یا جذب و انتقال مواد غذایی را در گیاهان افزایش دهند (Sharifi and Ryu, 2018).

در پژوهش حاضر، ایندول بیش‌ترین تأثیر را در افزایش شاخص‌های رشدی بررسی شده از جمله وزن تر و خشک ریشه داشت. در مطالعات قبلی، این ترکیب علاوه بر افزایش طول ریشه اصلی و طول و تعداد ریشه‌های جانبی، سبب افزایش تراکم تارهای کشنده ریشه شده و در نهایت سطح و حجم ریشه را نیز افزایش داده است (Bailly et al., 2014; Castulo-Rubio et al., 2015). برخی محققین بیان کرده‌اند ایندول با ایجاد تعدیل در انتقال و سیگنال‌رسانی اکسین، نقش مهمی در تنظیم رشد و توسعه ریشه‌های جانبی در آرابیدوپسیس دارد (Bailly et al., 2014).

نتیجه‌گیری

استفاده از ترکیبات فرار می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد جدید و نویدبخش جهت مدیریت تلفیقی بیماری برق‌زدگی نخود و تحریک رشد این گیاه استفاده شود. قبل از توسعه و انتشار تجاری این ترکیبات در برنامه‌های مدیریت بیماری لازم است آزمایش‌های گسترده‌ای روی عوارض جانبی این ترکیبات بر ارگانیسم‌های مفید یا غیر هدف و انسان‌ها صورت گیرد. تعیین بهترین غلظت مؤثر، حل مشکلات

فنی کاربرد ترکیبات فرار از جمله تبخیر سریع آن‌ها، تهیه فرمولاسیون‌های مناسب و استانداردسازی روش‌های کاربرد از دیگر موضوعاتی است که لازم است در تحقیقات آینده مدنظر محققین قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از آقای دکتر سعید عباسی (دانشگاه رازی) بابت در اختیار نهادن جدایه قارچ بیمارگر مورد استفاده در این تحقیق کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

Ahmad, S., Khan, M.A., Ahmad, I., Iqbal, Z., Ashraf, E., et al. 2021. Efficacy of fungicides, plant extracts and biocontrol agents against Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. Plant Science Today, 8(2): 255–262.

Ali, G.S., Norman, D. and El-Sayed, A.S. 2015. Soluble and volatile metabolites of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRS): Role and practical applications in inhibiting pathogens and activating induced systemic resistance (ISR) In: Bais, H. and Sherrier, J. (Eds.), Plant Microbe Interactions, pp. 241–284.

Bailly, A., Groenhagen, U., Schulz, S., Geisler, M., Eberl, L., et al. 2014. The inter-kingdom volatile signal indole promotes root development by interfering with auxin signalling. The Plant Journal, 80(5): 758–771.

Baite, M.S., and Dubey, S.C. 2018. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea in India. Physiological and Molecular Plant Pathology, 102: 122–127.

Batterman, S.A. 1995. Sampling and analysis of biological volatile organic compounds In: Burge, H.A. (Ed.), Bioaerosols. CRC Press, Boca Raton, pp. 249–268.

Ben Mohamed, L., Cherif, M., Harrabi, M., Galbraith, R.F., and Strange, R.N. 2010. Effects of sowing date on severity of blight caused by *Ascochyta rabiei* and yield components of five chickpea cultivars grown under two climatic conditions in Tunisia. European Journal of Plant Pathology, 126(3): 293–303.

Benzohra, E.E., Bendahmane, B.S., Labdi, M., and Benkada, M.Y. 2012. Determination of pathotypes and physiological races in *Ascochyta rabiei*, the agent of ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Algeria. African Journal of Agricultural Reseearch, 7(7): 1214–1219.

Benzohra, I.E., Bendahmane, B.S., Labdi, M., and Bnekada, M.Y. 2013. *In vitro* biocontrol using the antagonist *Trichoderma harzianum* against the algerian isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of Ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Microbiological Research 2(2): 124–128.

Benzohra, I.E., Bendahmane, B.S., Benkada, M.Y., Mégateli, M., and Belaidi, H. 2020. Use of three synthetic fungicides to reduce the incidence of Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.): A susceptible cultivars case. Indian Journal of Agricultural Research, 54: 459–464.

Bhattacharyya, D., Garladinne, M., and Lee, Y. 2015. Volatile indole produced by rhizobacterium *Proteus vulgaris* JBLS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. Journal of Plant Growth Regulation, 34(1): 158–168.

Bhattacharyya, P.N., and Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4): 1327–1350.

Castulo-Rubio, D.Y., Alejandre-Ramírez, N.A., Orozco-Mosqueda, M.d.C., Santoyo, G., Macías-Rodríguez, L.I., et al. 2015. Volatile organic compounds produced by the rhizobacterium *Arthrobacter agilis* UMCV2 modulate *Sorghum bicolor* (strategy II plant) morphogenesis and SbFRO1 transcription *in vitro*. Journal of Plant Growth Regulation, 34(3): 611–623.

Chang, K.F., Ahmed, H.U., Hwang, S.F., Gossen, B.D., Strelkov, S.E., et al. 2007. Sensitivity of field populations of *Ascochyta rabiei* to chlorothalonil, mancozeb and pyraclostrobin fungicides and effect of strobilurin fungicides on the progress of ascochyta blight of chickpea. Canadian journal of plant science, 87(4): 937–944.

Chen, W., Coyne, C.J., Peever, T.L., and J. Muehlbauer, F. 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. Plant Pathology, 53(6): 759–769.

Choi, H.K., Song, G.C., Yi, H.-S., and Ryu, C.-M. 2014. Field Evaluation of the bacterial volatile derivative 3-pentanol in priming for induced resistance in pepper. Journal of Chemical Ecology, 40(8): 882–892.

Chongo, G., Buchwaldt, L., Gossen, B.D., Lafond, G.P., May, W.E., et al. 2003. Foliar fungicides to manage ascochyta blight *Ascochyta rabiei* of chickpea in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 25(2): 135–142.

Chung, J.H., Song, G.C., and Ryu, C.M. 2016. Sweet scents from good bacteria: Case studies on bacterial volatile compounds for plant growth and immunity. Plant Molecular Biology, 90(6): 677–687.

Cortes-Barco, A.M., Goodwin, P.H., and Hsiang, T. 2010. Comparison of induced resistance activated by benzothiadiazole, (2R,3R)-butanediol and an isoparaffin mixture against anthracnose of *Nicotiana benthamiana*. Plant Pathology, 59(4): 643–653.

Davidson, J.A., and Kimber, R.B.E. 2007. Integrated disease management of ascochyta blight in pulse crops. European Journal of Plant Pathology, 119(1): 99–110.

Dhakshinamoorthy, D., Sundaresan, S., Iyadurai, A., Subramanian, K.S., Janavi, G.J., et al. 2020. Hexanal vapor induced resistance against major postharvest pathogens of banana (*Musa acuminata* L.). The Plant Pathology Journal, 36(2): 133–147.

El-Hasan, A., Walker, F., Schöne, J., and Buchenauer, H. 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. Journal of Plant Diseases and Protection, 114(2): 62–68.

Ennouri, A., Lamiri, A., Essahli, M., and Krimi Bencheqroun, S. 2020. Chemical composition of essential oils and their antifungal activity in controlling *Ascochyta rabiei*. Journal of Agricultural Science and Technology, 22(5): 1371–1381.

Faheem, M., Raza, W., Zhong, W., Nan, Z., Shen, Q., et al. 2015. Evaluation of the biocontrol potential of Streptomyces goshikiensis YCXU against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Biological Control, 81: 101–110.

Farag, M.A., Zhang, H., and Ryu, C.-M. 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: Induced resistance by bacterial volatiles. Journal of Chemical Ecology, 39(7): 1007–1018.

Farag, M.A., Ryu, C.-M., Sumner, L.W., and Paré, P.W. 2006. GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. Phytochemistry, 67(20): 2262–2268.

Farahani, S., Talebi, R., Maleki, M., Mehrabi, R., and Kanouni, H. 2019. Pathogenic diversity of *Ascochyta rabiei* isolates and identification of resistance sources in core collection of chickpea germplasm. The Plant Pathology Journal, 35(4): 321–329.

Fincheira, P., and Quiroz, A. 2018. Microbial volatiles as plant growth inducers. Microbiological Research, 208: 63–75.

Gan, Y.T., Siddique, K.H.M., MacLeod, W.J., and Jayakumar, P. 2006. Management options for minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Field Crops Research, 97(2–3): 121–134.

Garbeva, P., Hol, W.H.G., Termorshuizen, A.J., Kowalchuk, G.A., and Boer, W.d. 2011. Fungistasis and general soil biostasis - a new synthesis. Soil Biology & Biochemistry, 43(3): 469–477.

Gu, Y.-Q., Mo, M.-H., Zhou, J.-P., Zou, C.-S., and Zhang, K.-Q. 2007. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. Soil Biology and Biochemistry, 39(10): 2567–2575.

Han, S.H., Lee, S.J., Moon, J.H., Park, K.H., Yang, K.Y., et al. 2006. GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. Molecular Plant Microbe Interactions, 19(8): 924–930.

Huang, C.-H., Vallad, G.E., Zhang, S., Wen, A., Balogh, B., et al. 2012. Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-s-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. Plant Disease, 96(2): 221–227.

Huang, Y., He, Y., Ye, B.C., and Li, C. 2017. Rhizospheric *Bacillus subtilis* exhibits biocontrol effect against *Rhizoctonia solani* in pepper (*Capsicum annuum*). BioMed Research International, 2017: 1–9.

Javaid, A., Munir, R., Khan, I.H., and Shoaib, A. 2020. Control of the chickpea blight, *Ascochyta rabiei*, with the weed plant, *Withania somnifera*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30(1): 1–8.

Kai, M., Effmert, U., Berg, G., and Piechulla, B. 2006. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Archives of Microbiology, 187(5): 351–360.

Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., et al. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 81(6): 1001–1012.

Kalyanasundaram, G.T., Syed, N., and Subburamu, K. 2021. Recent developments in plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture In: Viswanath, B. (Ed.), Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry. Elsevier, pp. 181–192.

Kim, Y.C., and Anderson, A.J. 2020. Integration of bacterial volatile organic compounds with plant health In: Ryu, C.-M., Weisskopf, L. and Piechulla, B. (Eds.), Bacterial Volatile Compounds as Mediators of Airborne Interactions, pp. 201–213.

Larsen, T.O., and Frisvad, J.C. 1994. Production of volatiles and presence of mycotoxins in conidia of common indoor penicillia and aspergilli In: Samson, R.A., Flannigan, B., Flannigan, M.E., Verhoeff, A.P., Adan, O.C.G. and Hoekstra, E.S. (Eds.), Health Implications of Fungi in Indoor Environments. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 251–279.

Lee, B., Farag, M.A., Park, H.B., Kloepper, J.W., Lee, S.H., et al. 2012. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa*. PloS One, 7(11): e48744.

Li, X., Wang, X., Shi, X., Wang, B., Li, M., et al. 2020. Antifungal Effect of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. Processes, 8(12): 1–14.

Liu, N., Xu, S., Yao, X., Zhang, G., Mao, W., et al. 2016. Studies on the control of Ascochyta blight in field peas (*Pisum sativum* L.) caused by *Ascochyta pinodes* in Zhejiang Province, China. Frontiers in Microbiology, 7: 481.

Manjunatha, L., Saabale, P.R., Srivastava, A.K., Dixit, G.P., Yadav, L.B., et al. 2018. Present status on variability and management of *Ascochyta rabiei* infecting chickpea. Indian Phytopathology, 71(1): 9–24.

Meldau, D.G., Meldau, S., Hoang, L.H., Underberg, S., Wunsche, H., et al. 2013. Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus* sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. The Plant Cell, 25(7): 2731–2747.

Nene, Y., Reddy, M., Haware, M., Ghanekar, A., Amin, K., et al. 2012. Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. Information Bulletin No. 28. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, India, pp. 60.

Nene, Y.L. 2008. A review of Ascochyta blight of chickpea. Tropical Pest Management, 28(1): 61–70.

Nizam, S., Singh, K., and Verma, P.K. 2010. Expression of the fluorescent proteins DsRed and EGFP to visualize early events of colonization of the chickpea blight fungus *Ascochyta rabiei*. Current Genetics, 56(4): 391–399.

Ossowicki, A., Jafra, S., and Garbeva, P. 2017. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. PloS One, 12(3): e0174362.

Owati, A.S., Agindotan, B., Pasche, J.S. and Burrows, M. 2017. The Detection and Characterization of QoI-Resistant Didymella rabiei Causing Ascochyta Blight of Chickpea in Montana. Frontiers in Plant Science, 8: 1165.

Parida, S.K., Gayacharan, Rani, U., Singh, S., Basandrai, A.K., et al. 2020. Identification of novel resistant sources for ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea. PloS One, 15(10): e0240589.

Piechulla, B., Lemfack, M.C., and Kai, M. 2017. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. Plant, Cell and Environment, 40(10): 2042–2067.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology, 5(5): 308–316.

Raza, W., and Shen, Q. 2020. Volatile organic compounds mediated plant-microbe interactions in soil In: Sharma, V. and Al-Ani, L.K.T. (Eds.), Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture, pp. 209–219.

Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Kunjeti, S.G., Donofrio, N.M., Czymmek, K.J., et al. 2010. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. Communicative and Integrative Biology, 3(2): 130–138.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., et al. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 134(3): 1017–1026.

Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., et al. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(8): 4927–4932.

Safari, E., Sharifi, R., and Abbassi, S. 2020. Inhibition of wheat take-all disease using defenses-inducing compounds. Journal of Applied Research in Plant Protection, 9(3): 1–10 (In Farsi with English summary).

Santoro, M., Cappellari, L., Giordano, W., and Banchio, E. 2015. Production of volatile organic compounds in PGPR In: Cassán, F.D., Okon, Y. and Creus, C.M. (Eds.), Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols, pp. 307–317.

Schulz, S., and Dickschat, J.S. 2007. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. Natural Product Reports, 24(4): 814–842.

Seydi, L. 2014. Evaluation of some chickpea lines for resistance to *Ascochyta rabiei* causal agent of blight. M.Sc. Thesis. Razi University, Kermanshah, Iran.

Sharifi, R., and Ryu, C.-M. 2016. Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? Frontiers in Microbiology, 7: doi:10.3389/fmicb.2016.00196.

Sharifi, R., and Ryu, C.M. 2018. Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. Annals of Botany, 122(3): 349–358.

Sharifi, R., Ahmadzadeh, M., Behboudi, K., and Ryu, C. 2013. Role of *Bacillus subtilis* volatiles in induction of systemic resistance in Arabidopsis. Iranian Journal of Plant Protection Science, 44(1): 91–101 (In Farsi with English summary).

Sharma, M., Pande, S., and Rathore, A. 2010. Effect of growth stages of chickpea on the genetic resistance of Ascochyta blight. European Journal of Plant Pathology, 128(3): 325–331.

Song, G., and Ryu, C.-M. 2013. Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. International Journal of Molecular Sciences, 14(5): 9803–9819.

Tadesse, M., Turoop, L., and Ojiewo, C.O. 2017. Survey of chickpea *Cicer arietinum* L) Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei* Pass.) disease status in production regions of Ethiopia. Plant, 5(1): 23.

Tahir, H.A., Gu, Q., Wu, H., Niu, Y., Huo, R., et al. 2017a. Bacillus volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. Scientific Reports, 7: 40481.

Tahir, H.A.S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., et al. 2017b. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. Frontiers in Microbiology, 8: 171.

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J.S., Vos, M. and Garbeva, P. 2017. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. Trends in Microbiology, 25(4): 280–292.

Vafaei, S., Rezaee, S., Moghadam, A.A., and Zamanizadeh, H. 2017. Screening of Chickpea germ plasms for selection of resistant genotypes to Ascochyta blight. Applied Entomology and Phytopathology, 85(1): 97–110 (In Farsi with English summary).

Veselova, M.A., Plyuta, V.A., and Khmel, I.A. 2019. Volatile compounds of bacterial origin: Structure, biosynthesis, and biological activity. Microbiology, 88(3): 261–274.

Vespermann, A., Kai, M. and Piechulla, B. 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. Applied and Environmental Microbiology, 73(17): 5639–5641.

Wang, K., Liu, J., Zhan, Y., and Liu, Y. 2019. A new slow-release formulation of methyl salicylate optimizes the alternative control of *Sitobion avenae* (Fabricius) (Hemiptera: Aphididae) in wheat fields. Pest Management Science, 75(3): 676–682.

Whillans, F.D., and Lamont, G.S. 1995. Fungal volatile metabolites released into indoor air environments: variation with fungal species and growth media., pp. 47–50 In: Morawska, L., Bofinger, N.D. and Maroni, M. (Eds.), Proceedings of the International workshop Indoor Air—An Integrated Approach, Gold Coast Australia.

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., and Huang, Q. 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Applied and Environmental Microbiology, 78(16): 5942–5944.

Yuan, J., Zhao, M., Li, R., Huang, Q., Raza, W., et al. 2017. Microbial volatile compounds alter the soil microbial community. Environmental Science and Pollution Research International, 24(28): 22485–22493.

Zhang, H., Xie, X., Kim, M.S., Kornyeyev, D.A., Holaday, S., et al. 2008. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels *in planta*. Plant Journal, 56(2): 264–273.

Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M.S., Dowd, S.E., et al. 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. Plant Journal, 58(4): 568–577.

Zhao, L.-j., Yang, X.-n., Li, X.-y., Mu, W., and Liu, F. 2011. Antifungal, insecticidal and herbicidal properties of volatile components from *Paenibacillus polymyxa* strain BMP-11. Agricultural Sciences in China, 10(5): 728–736.

Zou, C.-S., Mo, M.-H., Gu, Y.-Q., Zhou, J.-P., and Zhang, K.-Q. 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. Soil Biology and Biochemistry, 39(9): 2371–2379.

© 2021 Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International. (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

The effect of some defense inducing volatile compounds against chickpea *Ascochyta* blight

N. Moarrefzadeh [1]*, H. Khateri[1] and R. Sharifi[1]

1. ***Corresponding Author:** Assistant professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran (n.moarrefzadeh@razi.ac.ir)

(DOI): 10.22055/ppr.2021.17059

Received: 9 June 2021 Accepted: 18 Auust 2021

Abstract

Background and Objectives

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is the third most important legume crop in the world. Ascochyta blight caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. is one of the most important threats for producing chickpea in most of the growing areas. The pathogen invades all aerial parts of the plant and causes severe yield and quality losses. The present study aims to evaluate the effect of some defense inducing volatile compounds in inhibiting *A. rabiei*, as well as the effect of these compounds on some chickpea growth traits at the presence of the pathogen.

Materials and Methods

First, six volatile compounds including methyl salicylate, 2,3-butanediol, methyl-jasmonate, acetoin, indole and 3-pentanol were prepared in sterile distilled water (100 µM) containing 0.2% Tween 20, and were used for laboratory and greenhouse studies. The *in vitro* antifungal activity of volatile compounds was tested on chickpea seed meal dextrose agar (CDA) medium. Then, a five-millimeter agar disk containing the mycelium of the pathogen was placed on the surface of CDA medium in 9 cm diameter Petri dishes. The Petri dishes were inverted and 100 µl of the emulsion of each volatile compound was placed inside the lid. The Petri dishes were sealed and kept at the same inverted position to avoid the dropping of volatile compounds over the culture medium. A greenhouse experiment with nine treatments (including six volatile compounds, chlorothalonil fungicide, healthy and diseased controls) was conducted in a completely randomized design. In addition, the emulsions of volatile compounds were sprayed on the leaf surfaces 12 days after sowing chickpea seeds (variety Bivanij). After 48 hours, the conidial suspension of the pathogen in water (2 x 10^4 conidia/mL) was sprayed to the surface of chickpea seedlings. Disease severity and plant growth indices including shoot fresh weight, shoot dry weight, root fresh weight and root dry weight were measured two weeks after inoculation. Statistical analyses were performed by SAS software (version 9.3). The means were compared by Duncan's test at a statistical probability level of 5%.

Results

All volatile compounds inhibited the mycelial growth of *A. rabiei* on CDA with the highest (64.91%) and lowest (4.67%) inhibition obtained by 3-pentanol and methyl jasmonate, respectively. In the greenhouse test, all volatile compounds, except methyl jasmonate, reduced the incidence of blight symptoms compared to the diseased control. The highest disease reduction was obtained by chlorothalonil (86.04%) and methyl salicylate (55.81%). At the presence of the pathogen, all volatile compounds increased root fresh weight, root dry weight and shoot fresh weight, and increased shoot dry weight

with the exception of 3-pentanol and methyl jasmonate. Compared to the diseased control, the effect of indole on root fresh and dry weight and shoot dry weight, as well as the effect of methyl salicylate on shoot fresh weight was more than other compounds. Methyl jasmonate had the least improving effect on growth traits compared to other volatile compounds.

Discussion

The volatile compounds used in this study inhibited *A. rabiei* in both *in vitro* and greenhouse tests. They also improved chickpea growth parameters at the presence of the pathogen. The use of volatile compounds could be considered as a new and promising strategy for the integrated management of *Ascochyta* blight.

Keywords: Ascochyta rabiei, Induced resistance, Growth promotion