مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۴، شماره ۱، ۱۳۹۲ (۱۰۱-۹۱)

نقش ترکیبات فرار *Bacillus subtilis* در القاء مقاومت علیه *Botrytis cinerea* در آرابیدوبسیس

روح اله شریفی[۱]، مسعود احمد زاده[۲]*، کیوان بهبودی[۳] و چونگ مین ریو[۴]
۱، ۲، ۳، دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۴، استاد بخش بیوتکنولوژی صنعتی، پژوهشگاه علوم زیستی و بیوتکنولوژی کره جنوبی
(تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۳۱ - تاریخ تصویب: ۹۲/۳/۷)

چکیده

عوامل بیوکنترل با الایسیتورهای[۱] متعددی از جمله ترکیبات فرار باعث القاء مقاومت سیستمیک در گیاهان می‌شوند. در این تحقیق نقش ترکیبات خالص شناسائی شده در پروفایل ترکیبات فرار سویه *Bacillus subtilis* GB03 در بازداری مستقیم از رشد یا القاء مقاومت سیستمیک علیه قارچ *B. cinerea* در آرابیدوبسیس مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مقایسه با شاهد همه ترکیبات نه تنها مانع اسپورزائی قارچ نشدند بلکه به صورت معنی داری آن را افزایش دادند. بیشترین اثر در تحریک اسپورزائی با $۴/۷\times۱۰^{۵}$ و ۴×۱۰^{۵} افزایش تولید اسپور به ترتیب مربوط به دو ترکیب ۳-پنتانول و متیل‌سالیسیلات بود. در رشد میسلیوم نیز اغلب ترکیبات باعث تحریک رشد قارچ شدند که بیشترین مقدار در مورد دو ترکیب متیل-جاسمونات با ۲۳٪ و متیل‌سالیسیلات با ۲۴٪ افزایش رشد قارچ ثبت شد. جالب توجه اینکه حداقل و حداکثر تولید رنگیزه نیز به ترتیب در تیمارهای متیل‌جاسمونات و متیل‌سالیسیلات اندازه‌گیری شد. در آزمایش القاء مقاومت، ترکیبات ۳-هیدروکسی-۲-بوتانول، متیل-جاسمونات، بوتان‌دیول، استوئین و ۱-پنتانول بیشترین اثر را در کاهش بیماری روی آرابیدوبسیس دارا بودند. در حالی‌که دو ترکیب متیل‌سالیسیلات و ۳-پنتانول که به عنوان تحریک کننده مقاومت علیه بیوتروف‌ها شناخته شده‌اند تأثیر قابل توجه ای در کاهش این بیمارگر نکروتروف نداشتند. در نهایت امر کارائی ترکیبات بستگی به دُز مصرفی آن‌ها دارد و در دُز پایین بیشتر به عنوان مولکول پیام عمل می‌کنند تا به عنوان بازدارنده از رشد قارچ بیمارگر.

واژه های کلیدی: ترکیبات فرار، القاء مقاومت، *Bacillus subtilis*، *Botrytis cinerea*

مقدمه

عوامل بیماری‌زای گیاهی در زیست بوم خود تحت تأثیر شبکه ای از موجودات زنده دیگر قرار می‌گیرند که این موجودات با به‌کارگیری مکانیسم‌های مختلفی از جمله آنتی‌بیوز، رقابت و القاء مقاومت در میزبان باعث مهار عوامل بیماری‌زا می‌شود (O'Sullivan & O'Gara,1992). شناسائی دقیق و استفاده از این عوامل می‌تواند کمک شایانی در مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهی داشته باشد (Kleopper *et al*., 2004). اما متأسفانه، در بسیاری از موارد مکانیسم دقیق بیوکنترلی این عوامل در هاله ای از ابهام قرار دارد.

1. Elicitors

* نویسنده مسئول: مسعود احمد زاده تلفن: ۰۹۱۲۲۶۰۹۱۰۰ E-mail: ahmadz@ut.ac.ir

به طوری که محققان مختلف، مکانیسم‌های مختلفی را به یک عامل کنترل بیولوژیک مشخص نسبت می‌دهند و یا حتی به صورت جزئی‌تر مکانیسم‌های متعددی را عامل اثر گذاری یک متابولیت خاص می‌دانند (Ongena & Jacques, 2008). ترکیبات فرار هم به عنوان متابولیت‌های موثر در کنترل بیولوژیک از این قاعده مستثنی نیستند (Insam & Seewald, 2010). ترکیبات فرار مجموعه‌ای از متابولیت‌ها، با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۳۰۰ دالتون)، قطبیت کم و فشار بخار بالا هستند (Vespermann *et al*., 2007). اثرات زیستی متعددی از جمله ارتباطات درون و بین گونه‌ای و بازدارندگی از رشد نماتدها، گیاهان و قارچ‌ها به ترکیبات فرار باکتری‌ها نسبت داده شده است (Insam & Seewald, 2010; Choudhary *et al*., 2008; Kai *et al*., 2009). گزارش‌های متعددی از نقش این ترکیبات در بازدارندگی رشد قارچ‌های بیمارگر وجود دارد. از اولین کارهایی که در مورد اثر ترکیبات فرار روی قارچ‌ها منتشر شد، گزارشی است که توسط مک‌کاین (۱۹۶۶) دال بر اثر ترکیبات فرار *Streptomyces* در کاهش تولید اسکلروت قارچ‌های *Sclerotium cepivorum* و *Rhizoctonia solani* ارائه شد. پس از آن تحقیقات متعددی در این زمینه منتشر شده است که توسط کای و همکاران (۲۰۰۹) خلاصه شده‌اند. در این میان، دو گزارش جامع، توان بازدارندگی از رشد قارچ‌ها به وسیله ترکیبات فرار باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های خاکزی را مورد ارزیابی قرار داده‌اند. وتلی و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که ۲۵۰ باکتری خاک می‌توانند به نسبت‌های متفاوت باعث کاهش یا افزایش رشد میسلیوم قارچ‌ها شوند و مؤثرترین باکتری از این مجموعه *Pseudomonas fluorescens* بوده است. زو و همکاران (۲۰۰۷) نیز در یک آزمایش جامع نشان دادند که از میان ۱۰۱۸ باکتری، ۳۲٪ آن‌ها قادر به تولید مواد فرار بازدارنده از رشد قارچ‌ها بودند. به صورت جزئی‌تر، گزارش‌هایی هم مبنی بر نقش ترکیبات فرار در ایجاد بدشکلی، ضخیم شدن دیواره، کاهش اسپورزائی و گرانوله شدن سلول‌های قارچ‌ها منتشر شده است (Moore-Landecker & Stotzky, 1973). در کنار تحقیقات مربوط به بازدارندگی مستقیم بیمارگرها، در سال‌های اخیر گزارش‌های محدود ولی موثقی در مورد نقش ترکیبات فرار در القاء مقاومت سیستمیک به بیمارگرها و آفات گیاهی منتشر شده است. اولین بار ریو و همکاران (۲۰۰۳ و ۲۰۰۴) نقش ترکیبات فرار در افزایش رشد گیاهان و همچنین در بالا بردن توان دفاعی گیاهان را به اثبات رساندند و منشأ کارهای بعدی در این زمینه شدند. این گروه با استفاده از ترکیب خالص بوتان‌دیول و باکتری‌های موتانت آن، بوتان دیول را عامل اصلی اثر ترکیبات فرار سویه *Bacillus subtilis* GB03 معرفی کردند. در گزارش دیگر رودراپا و همکاران (۲۰۱۰) ترکیب استوئین سویه FB17 از همین گونه باکتری را عامل اصلی القاء مقاومت آرابیدوبسیس علیه *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ذکر کردند. در این تحقیق نیز از موتانت استوئین و استوئین خالص استفاده شده است. در هر دو گزارش از نقش احتمالی ترکیبات دیگر چشم پوشی شده است. علاوه بر اثر روی کنترل بیمارگرها و افزایش سلامت گیاه، مشخص شده است که ترکیبات فرار برخی باکتری‌ها باعث بهبود رشد گیاه نیز می‌شوند که این افزایش گاهی تا ۶ برابر نیز رسیده است (Ryu *et al*., 2003). وسپرمن و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که *Burkholderia cepacia* باعث ۲۰٪ افزایش رشد آرابیدوبسیس می‌شود. کای و پیچولا (۲۰۰۹) نشان دادند که *Serratia odorifera* به دلیل تولید ترکیب فرار دی‌اکسید کربن باعث افزایش رشد آرابیدوبسیس تا سه برابر می‌شود. در کنار این معدودی از محققان نیز ترکیبات فراری را گزارش کرده‌اند که روی رشد گیاه اثر منفی می‌گذارند مانند ترکیب سیانید هیدروژن که باعث جلوگیری از تنفس و در نتیجه کاهش رشد و مرگ بافت‌های گیاهی می‌شود (Blom *et al*., 2011). هرچند همین ترکیب اخیر در برخی گیاهان خاص همانند توتون باعث افزایش ریشه‌زائی شده است (Defago *et al*., 1990). این تنوع در گزارش‌ها می‌تواند به علت ماهیت متنوع و پیچیده ترکیبات فرار باشد. چرا که موادی با خصوصیت شیمیائی متنوع در گروه ترکیبات فرار قرار می‌گیرد. به عبارت دیگر بسته به مکانیسم تشخیصی که موجودات زنده از این ترکیبات دارند یا مکانیسم اثری که هر کدام می‌توانند داشته باشند، اثر آن‌ها می‌تواند مثبت یا منفی

باشد. شولز و دیکس چات (۲۰۰۷) اعلام کردند که ۳۴۶ ترکیب فراری که شناسائی شده‌اند در گروه های شیمیائی متنوعی قرار می‌گیرند که گروه غالب آن‌ها ترپنوئیدها هستند. متأسفانه گزارش‌ها مبنی بر اهمیت اجزاء تشکیل دهنده ترکیبات فرار باکتری‌ها در کنترل قارچ‌ها قلیل است. از جمله فرناندو و همکاران (۲۰۰۵) به صورت کیفی نشان دادند که ترکیب دکانال که به صورت متمایزی توسط سویه *Pseudomonas chlororaphis* PA23 تولید می‌شود نقش بارزی در بازداری از رشد و تولید اسکلروت قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiourom* دارد. اما در مورد نقش نماتد ستیزی این ترکیبات دو گزارش جامع منتشر شده است. گیو و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که نُه ترکیب فرار خالص از گروه‌های شیمیائی متفاوت باعث مرگ و میر دو نماتد *Bursaphelenchus xylophilus* و *Panagrellus redivivus* تا میزان ۱۰۰٪ شدند. هوانگ و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که پنج ترکیب فرار از باکتری *Bacillus megatrium* روی لاروها و تفریخ تخم نماتد *Meloidogyne incognita* از ۱۰۰-۸۰٪ اثر گذاشتند. اما با توجه به بررسی منابع نگارندگان چنین گزارش‌هایی در مورد فعالیت قارچ کشی ترکیبات فرار موجود نیست. لذا لازم می‌نمود تا اثر هر کدام از اجزاء اصلی ترکیبات فرار به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق تعدادی از ترکیبات اصلی موثر در پروفایل ترکیبات فرار سویه *B. subtilis* GB03 بر اساس کارهای پیشین (Ryu *et al*., 2004; Farag *et al*., 2006) انتخاب شده و اثر آن‌ها بر فنولوژی و بیماری‌زائی بیمارگر *B. cinerea* روی گیاه آرابیدوبسیس مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیباتی انتخاب شدند که نرخ تولید آن‌ها در سویه های بیوکنترلی GB03 و IN937a بیش‌تر از سویه های غیر بیوکنترلی باشد.

مواد و روش‌ها

ترکیبات فرار مورد استفاده

در جدول (۱) لیست ترکیبات فرار مورد استفاده در این تحقیق آورده شده است. ترکیبات مورد استفاده در دمای اتاق نگهداری شدند به غیر از استوئین که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با استفاده از امولسیون کننده سلوت® غلظت ۱۰۰ میکرومول این ترکیبات در آب مقطر استریل تهیه شد (Koornneef & Pieterse, 2008). از غلظت ۰/۰۲٪ سلوت هم برای تهیه امولسیون ترکیبات فرار و هم به عنوان شاهد استفاده گردید.

جدول۱- مشخصات ترکیبات خالص مورد استفاده در این پژوهش.

نام عمومی ترکیب	گروه شیمیائی		شرکت سازنده/خلوص	توضیحات	منبع
استوئین	کتون	۱)	***Aldrich 96%***	فراورده تخمیر، القاء کننده مقاومت	Fujita, 2009; Rudrappa *et al*., 2010
۲و۳-بوتاندیول	الکل	۲)	***Aldrich/ 98%***	مشتق شده از استوئین، القاء کننده مقاومت	Fujita, 2009; Ryu *et al*., 2004
۲-هیدروکسی-۳-پنتانون	کتون		Aldrich 98%	فاقد اطلاعات	----
۱-پنتانول	آمیل الکل		/99.8% Fluka	بازدارنده لیپاز فوزاریوم	Maia *et al*., 1999
۳-پنتانول	آمیل الکل		Aldrich/99/8%	فرمون حشرات، القاء کننده مقاومت در فلفل	Ryu *et al*., unpublished
متیل‌جاسمونات	آروماتیک		**Aldrich/95%**	هورمون گیاهی، القاء کننده مسیر JA	Piterse *et al*., 2009
متیل‌سالیسیلات	هیدروکسی بنزوئیک اسید		**Fluka/99.0%**	هورمون گیاهی، القاء کننده مسیر SA	Volt *et al*., 2008

اثر ترکیبات فرار در تحریک رشد میسلیوم و تولید رنگیزه قارچ

این آزمایش مطابق با روش فیدمن و روسال (۱۹۹۳) انجام شد. بدین صورت که قرص‌هایی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. از طرف دیگر تشتک‌های حاوی محیط کشت TSA تهیه شده و یک قرص کاغذی جاذب در مرکز آن‌ها قرار گرفت. مقدار ۵۰ میکرولیتر از امولسیون هر یک از ترکیبات فرار به قرص‌ها اضافه شد. با کنار گذاشتن درب تشتک‌ها ، تشتک‌های حاوی قارچ به طور وارونه روی تشتک‌های حاوی ترکیبات فرار قرار داده شدند و لبه تشتک‌ها روی هم قرار گرفته و توسط نوار پارافیلم کاملاً مسدود گردیدند. تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ºC قرار داده شدند. برای شاهد از ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۲٪ سلوت استفاده شد. با توجه به

این‌که رشد قارچ در برخی تیمارها بیشتر از شاهد بود لذا به جای شاهد درصد رشد شعاعی قارچ نسبت به تیماری سنجیده شد که بیشترین رشد را فراهم کرده بود. قطری از کلنی قارچ که میسلیوم‌ها تیره بودند به عنوان میزان تولید رنگیزه در نظر گرفته شد. در مواردی که تولید رنگیزه به صورت یکنواخت نبود میانگین کمترین و بیشترین قطر منطقه تولید رنگیزه در نظر گرفته شد.

نقش ترکیبات فرار در توانائی تولید اسپور قارچ

در این آزمون از تشتک‌های پتری دو بخشی استفاده شد (شکل۴). مشابه آنچه که در بالا ذکر شد قرص‌هایی از کلنی جوان قارچ در یک طرف ظرف کشت قرار داده شده و درون انکوباتور با دمای ۲۵°C به مدت ۳۶ ساعت قرار داده شدند. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از ترکیبات فرار در طرف دیگر تشتک پتری روی قرص کاغذی اضافه شد (Ryu *et al.*, 2003). در این روش امولسیون مورد استفاده و قارچ در یک تشتک قرار گرفتند ولی تیغه میانی مانع نفوذ امولسیون از طریق آگار شده و فقط ترکیبات فرار قادر بودند به قارچ برسند. پس از اسپورزائی کامل قارچ در تشتک شاهد، اسپورها با ۵۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک جمع آوری شدند. سوسپانسیون اسپور از پارچه ململ عبور داده شد و تعداد اسپور با استفاده از لام هماسایتومتر برآورد شد.

القاء مقاومت در آرابیدوبسیس علیه *B. cinerea*

بذور آرابیدوبسیس به مدت ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ روی شیکر ضدعفونی سطحی شدند و سپس ۴ بار با آب مقطر استریل شستشو و هیپوکلریت سدیم آن زدوده شد. بذور با تراکم مناسب روی تشتک‌های حاوی محیط کشت MS[1] (۰/۸٪ آگار گیاهی، ۱/۵٪ سوکروز و ۰/۴۴٪ نمک‌های MS با pH نهایی ۵/۸) پخش شدند (Ryu *et al.*, 2004). تشتک‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای۴°C ورنالیزه شدند و سپس به مدت سه روز در اتاقک رشد با چرخه روشنائی و تاریکی ۱۶ و ۸ ساعت و شدت نور ۸۰۰۰ لوکس و دمای ۲۲°C قرار داده شدند. پس از جوانه زنی، بذور در ظروف پتری دو بخشی جدید که حاوی محیط MS بودند نشاءکاری شدند، هر تشتک ۵ بذر. در بخش دیگر تشتک، قرص-های کاغذی ۰/۵ سانتی متری قرار داده شده و مقدار ۵۰ میکرولیتر امولسیون از هرکدام از ترکیبات فرار خالص به آن‌ها اضافه شد. تشتک‌های پتری با پارافیلم مسدود شدند و به اتاقک رشد با شرایط مشابه منتقل شدند. ۱۴ روز بعد پنج میکرولیتر سوسپانسیون 10^5 اسپور در میلی‌لیتر قارچ *B. cinerea* روی پنج برگ به ازای هر گیاه، مایه زنی شد. برگ‌های دارای علائم ۷۲ ساعت بعد از مایه زنی بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفتند (Veronese *et al.*, 2006).

تأثیر نوع محیط کشت در القاء مقاومت

این آزمایش مشابه آزمایش بالا انجام شد با این تفاوت که در بخش مقابل بذور کشت شده روی محیط MS، از محیط کشت MS یا TSA استفاده شد. یک قرص کاغذی در مرکز این بخش قرار داده شد و ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^9 CFU/ml سویه GB03 به دیسک کاغذی اضافه شد. فرض بر این بود که نوع محیط کشت قادر است ترکیب و نوع ترکیبات فرار باکتری را تغییر داده و در نهایت باعث تغییر توان بازدارندگی از بیماری شود. شرایط کشت و مایع زنی بیمارگر و بررسی بیماری عیناً مشابه آزمایش القاء مقاومت در آرابیدوبسیس بود (Veronese *et al.*, 2006).

تجزیه داده‌ها

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی دار[2] (LSD, P < 0/05) و با استفاده از روش مدل خطی[3] توسط نرم افزار SAS (SAS 9.1 SAS institute, Cary, NC) انجام گرفت. در همه آزمایش‌ها از طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با حداقل ۴ تکرار استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها حداقل دو بار تکرار شدند.

نتایج و بحث

اثر ترکیبات فرار در رشد میسلیوم و تولید رنگیزه قارچ

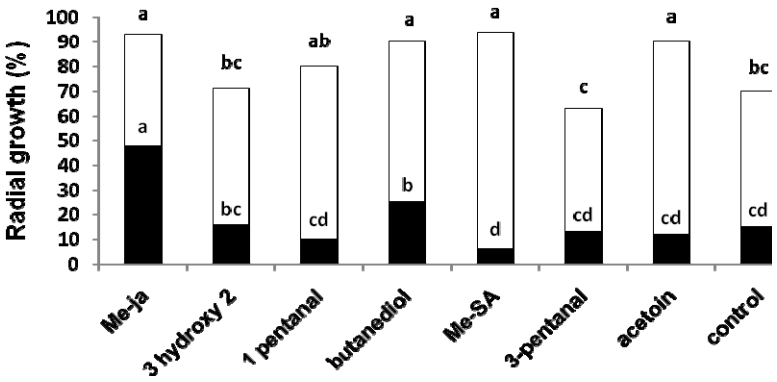
در این آزمایش ترکیبات فرار در اکثر موارد نه تنها باعث بازداری از رشد قارچ نشدند بلکه در مقایسه با شاهد باعث افزایش رشد آن نیز می‌شدند. بیشترین اثر تحریک

1. Murashige and Skoog (MS)

2. Least significance difference (LSD)

3. general linear model procedure (GLM)

کنندگی رشد به ترتیب به میزان ۲۴٪ و ۲۳٪ در تیمار های متیل‌جاسمونات و متیل‌سالیسیلات مشاهده شد که هر دو از هورمون‌های کلاسیک معروف در فعال سازی مسیرهای مقاومت گیاهان هستند (Piterse *et al.*, 2009; Volt *et al.*, 2008). از بین ترکیبات مورد آزمایش تنها ۳-پنتانول باعث کاهش رشد قارچ شد که البته از لحاظ آماری معنی دار نبود (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر ترکیبات فرار خالص بر رشد و تولید رنگیزه شبه گونه *Botrytis cinerea*: بخش تیره هر ستون نمایانگر میزان تولید رنگیزه در کلنی می‌باشد. ارزیابی میزان رشد قارچ به محض کامل شدن رشد قارچ در اولین تشتک پتری انجام شد. حروف روی ستون‌ها مربوط به مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با هم ندارند.

اگرچه اکثر باکتری‌های که تا کنون بررسی شده‌اند اثر منفی در رشد قارچ داشته‌اند، اما گزارش‌های معدودی نیز از افزایش رشد قارچ توسط ترکیبات فرار باکتری‌ها وجود دارد. از جمله باکتری‌های حامی میکوریزها[1] همچون *Pseudomonas monteilii* که قادر به افزایش رشد هیفی در *Pisolithus albus* می‌شود (Duponnois & Kisa, 2006). دی‌اکسیدکربن یک ترکیب فرار است که نقش مهمی در رشد قارچ‌ها و گیاهان دارد. گزارش‌هایی مبنی بر افزایش رشد قارچ *Gigaspora margarita* به وسیله دی‌اکسیدکربن گیاه آرابیدوبسیس و افزایش رشد آرابیدوبسیس به علت قرار گرفتن در معرض دی‌اکسیدکربن حاصل از باکتری *Serratia odorifera* وجود دارد (Kai & Piechulla, 2009). بر خلاف اثر روی افزایش رشد، ترکیبات فرار اثرات متفاوتی روی تولید رنگیزه قارچ داشتند. بیشترین اثر در افزایش رنگیزه به میزان ۳۳٪ مربوط به تیمار متیل‌جاسمونات بود و در پی آن بوتان‌دیول به میزان ۱۰٪ قرار گرفت. به هر حال، اغلب ترکیبات دیگر اثر معنی داری روی تولید رنگیزه نداشتند (شکل ۱).

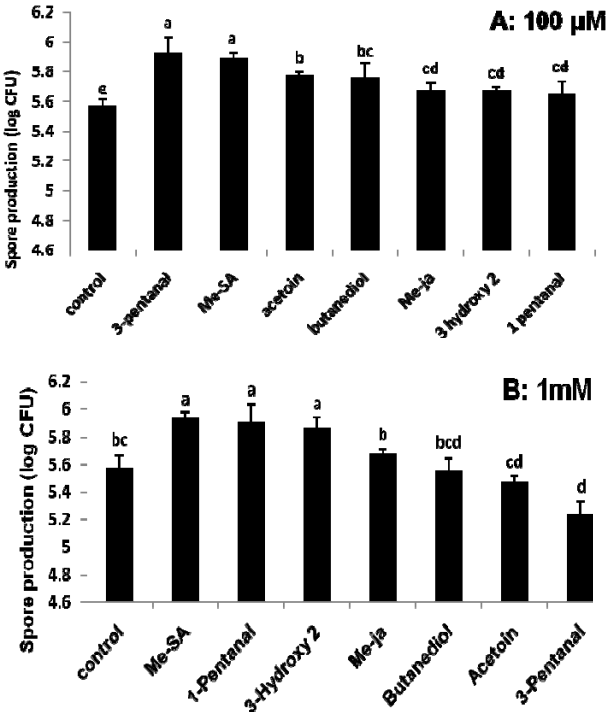
1. Mycorrhiza helper bacteria (MHB)

بازداری از تولید رنگیزه می‌تواند با اثر روی چسبندگی سطحی قارچ بر بیماریزائی آن اثر بگذارد. طبق گزارش کاو و همکاران (۲۰۰۶) رنگیزه ملانین نقش مهمی در چسبیدن به سطح و بیماریزائی قارچ‌ها ایفا می‌کند. بدین دلیل سم کارپروپامید که از قارچ کش‌های اسید کربوکسیلیک آمیدی است با اثر روی سنتز ملانین باعث کنترل قارچ‌ها می‌شود. لیو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که ترکیبات فرار حاصل از گونه های باسیلوس باعث بازداری کامل از تولید رنگیزه شدند. آنها در آزمایش خودشان قارچ را در معرض دُز بالایی از ترکیبات فرار قرار دادند که با نتایج گزارش حاضر قابل مقایسه نیست و در طبیعت نیز آزادسازی این حجم از ترکیبات فرار ممکن نمی‌باشد.

نقش ترکیبات فرار در توانائی تولید اسپور قارچ

یکی دیگر از مکانیسم‌های اثر ترکیبات فرار روی اسپورزائی و جوانه زنی اسپور قارچ‌ها است. گزارش‌های متعددی از نقش ترکیبات فرار در تولید و جوانه زنی اسپور منتشر شده است (Chen *et al.*, 2008; Herrington *et al.*, 1985). اثر روی تولید اسپور می‌تواند به عنوان یک مکانیسم موثر در کاهش گسترش و پراکنش قارچ‌های بیمارگر در نظر گرفته شود. در این

آزمایش دو غلظت ۱۰۰ میکرومول و یک میلی مول به کار گرفته شد. ترکیبات فرار با تغییر غلظت رفتار های متفاوتی را نشان دادند، برخی در غلظت پایین اثر محرک بیشتری را نشان داد و برخی بالعکس که می‌تواند دال بر متفاوت بودن غلظت بهینه موثر هر کدام از ترکیبات باشد (شکل ۲). اما در مجموع هیچ‌کدام از ترکیبات در غلظت ۱۰۰ میکرومول باعث کاهش اسپورزائی نشدند. از میان ترکیبات آزمایش شده ترکیب ۳-پنتانول بیشترین اثر را روی تولید اسپور قارچ نشان داد. در غلظت ۱۰۰ میکرومول این ترکیب تولید اسپور را به میزان $۴/۷\times۱۰^{۵}$ اسپور در میلی لیتر افزایش داد ولی جالب اینکه همین ترکیب در غلظت یک میلی مول باعث کاهش تولید اسپور به میزان ۲×۱۰^{۵} می‌شد (شکل ۲). این ترکیب از گروه آمیل الکل‌ها می‌باشد و بیشتر به عنوان فرمون حشرات شناخته می‌شود (Choi *et al.*, 2012). تا کنون نقش این ترکیب در کنترل قارچ‌ها گزارش نشده است. جالب توجه است که متیل-سالیسیلات که به عنوان مولکول پیام برای فعال شدن دفاع سیستمیک در گیاهان علیه بیمارگرهای بیوتروف موثر است در اینجا باعث افزایش تولید اسپور این قارچ نکروتروف در هر دو غلظت شده است (Volt *et al.*, 2008). به نظر می‌رسد این مولکول نه تنها در گیاهان بلکه در موجودات دیگر از جمله قارچ‌ها نیز به عنوان مولکول پیام عمل کنند.

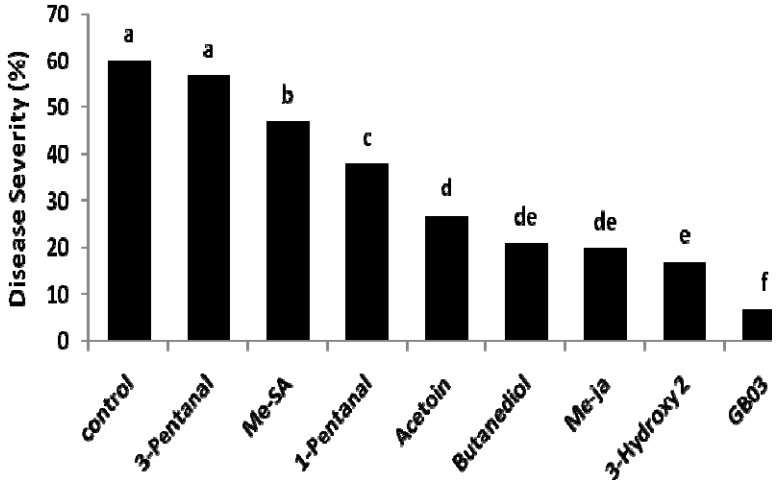


شکل ۲- نقش ترکیبات فرار خالص بر میزان تولید اسپور قارچ *Botrytis cinerea* در غلظت‌های ۱۰۰ میکرو مول (الف) و ۱ میلی مول (ب). داده‌ها بر حسب لگاریتم تعداد اسپور بر میلی لیتر است. حروف روی ستون‌ها مربوط به مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف مشابه از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با هم ندارند.

القاء مقاومت در آرابیدوبسیس علیه *B. cinerea*

بیشترین اثر و تفاوت بین ترکیبات فرار در القاء مقاومت سیستمیک در آرابیدوبسیس دیده شد (شکل ۳). در این آزمایش ترکیب ۳-هیدروکسی-۲-پنتانون بیشترین اثر را در کاهش بیماری ایفا کرد (۴۰٪). در آنالیز ترکیبات فرار باکتری‌های مختلف مشخص شد که دو سویه باسیلوس این ترکیب را حداقل به میزان ۷۰ برابر سویه‌های غیر القاء کننده ISR تولید می‌کنند (Farag *et al.*, 2006). این نسبت حتی بیشتر از استوئین و بوتان دیول است. ولی تا کنون تحقیقی در مورد این ترکیب گزارش نشده بود. به نظر می‌رسد مطالعه روی این ترکیب می‌تواند به نتایج امیدبخشی منتهی شود. در

پی آن ترکیبات متیل‌جاسمونات ، بوتان‌دیول و استوئین به ترتیب بیشترین اثر را روی افـزایش مقـاومـت علیـه *B. cinerea* نشـــان دادنـــد.



شکل ۳- نقش ترکیبات فرار خالص در القاء مقاومت سیستمیک در آرایبدوبسیس علیه *Botrytis cinerea*: حروف روی ستون‌ها مربوط به مقایسه میانگین‌ها در سطح ۵٪ می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با هم ندارند.

این نتایج تائید کننده تحقیقات ریو و همکاران (۲۰۰۴) و رودراپا و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد که به ترتیب اظهار کرده بودند که بوتان‌دیول و استوئین به صورت افتراقی در سویه های القاء کننده مقاومت سیستمیک[1] تولید شده و باعث القاء مقاومت در آرابیدوبسیس می‌شوند. رودراپا و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که استوئین باعث القاء همزمان مسیر های سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید می‌شود که دست کم، مسیر اخیر علیه بیمارگر نکروتروف *B. cinerea* موثر است. ترکیب متیل‌جاسمونات نیز باعث القاء مقاومت علیه *B. cinerea* شد. گزارشات متعددی وجود دارد که این ترکیب به عنوان سیگنال میزبان برای القاء ISR می‌باشد. این ترکیب به عنوان سیگنال فرار باعث القاء مقاومت در برگ‌های دور از محل آلودگی می‌شود (Farmer & Ryan, 1990). متیل‌جاسمونات مسیر وابسته به JA را فعـــال می‌کند که علیه نکروتروف‌هایی همچون *B. cinerea* موثر است (Pieterse *et al*., 2009). ترکیبات ۱-پنتانول اثر متوسطی در القاء مقاومت در میزبان داشت. این ترکیب هم در قارچ‌ها و هم در باکتری‌های بیوکنترلی گزارش شده است و دست کم در یک مورد باعث بازداری از فعالیت آنزیم لیپاز قارچ *Fusarium solani* شده است (Maia *et al*., 1999; Effmert *et al*., 2012).

اما به هر حال تا کنون گزارشی از نقش این ترکیب در القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی وجود نداشته است. ترکیب‌های متیل‌سالیسیلات و ۳-پنتانول به ترتیب کمترین اثر را در بازداری از بیماری‌زائی *B. cinrea* نشان دادند. ترکیب اخر باعث القاء مقاومت موثری علیه *P. syringae* pv. *lacrymans* شده است که یک بیمارگر همی بیوتروف است (Choi *et al*., 2012). مسیر القاء مقاومت علیه همی‌بیوتروف‌ها نیز همچون بیوتروف‌ها از طریق مسیر سالیسیلیک اسید است، لذا این ترکیب نیز همچون متیل‌سالیسیلات باعث فعال شدن مسیر سالیسیلیک اسید می شود.

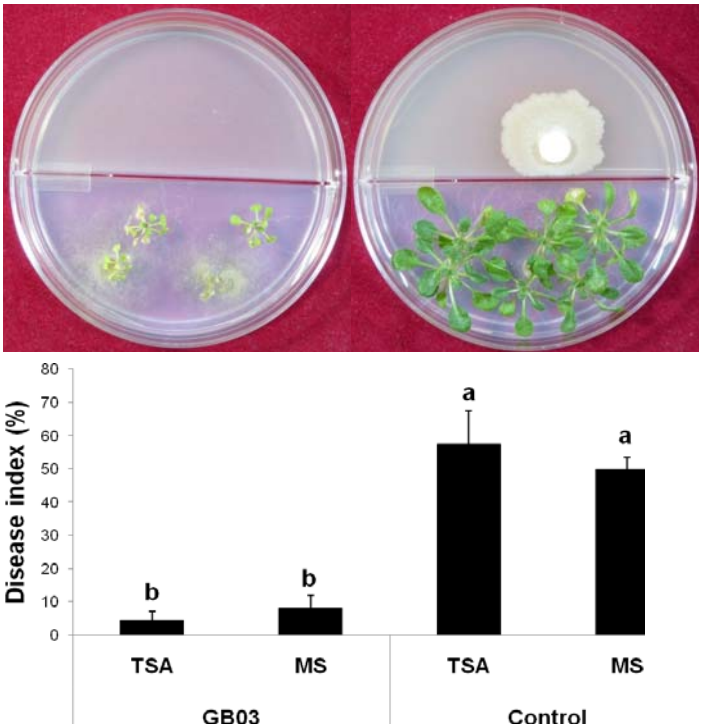
در نتیجه این ترکیبات نه تنها علیه نکروتروف‌هایی مثل *B. cinerea* موثر نیستند بلکه به علت وقوع پدیده تداخل[2] بین مسیر سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید قادرند باعث کاهش فعالیت مسیر وابسته به جاسمونیک اسید و در نتیجه کاهش مقاومت علیه بیمارگر نکروتروف *B. cinerea* شوند (Pieterse *et al*., 2009).

1. Induced Systemic resistance (ISR)

2. Cross-talk

تأثیر نوع محیط کشت در القاء مقاومت

در این آزمایش از دو نوع محیط کشت برای رشد باکتری‌ها استفاده شد. محیط TSA که یک محیط پیچیده[1] است و تمام مواد لازم برای رشد باکتری را داراست و محیط MS که یک محیط با اجزای مشخص[2] است. شکل کلنی در این دو محیط متفاوت بود. به علت اینکه بین تیمارها و شاهد یکنواختی واریانس وجود نداشت. تیمارها و شاهد به صورت جداگانه تجزیه آماری شدند. همان طور که در شکل(۴) قابل مشاهده است، نوع محیط کشت در افزایش توان بازدارنگی بیمارگر به واسطه ترکیبات فرار باکتری نقش دارد. ولی این نقش چندان زیاد نیست. علت را می‌توان این‌گونه تبیین کرد که هر دو محیط دارای مواد غذائی نسبتاً کاملی هستند و تمام فاکتورهای غذائی را برای باکتری فراهم می‌کنند. البته این شرایط بهینه در شرایط رقابتی ریزوسفر محتمل نیست. شاید بهتر باشد در یک آزمایش جداگانه و با استفاده از یک محیط حداقل، اثر سوبستراهای مختلف را در تولید ترکیبات فرار باکتری مورد ارزیابی قرار داد.



شکل ۴- تأثیر نوع محیط کشت در توان القاء مقاومت سیستمیک سویه GB03: سویه باکتری در دو محیط کشت MS آگار و TSA تلقیح شدند، گیاهان قرار گرفته شده در معرض ترکیبات فرار حاصل از این تیمارها با بیمارگر *Botrytis cinerea* تلقیح شدند و میزان بیماریزائی ارزیابی شد. مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تیمارهای با حروف مشابه اختلاف معنی داری با هم ندارند.

نتیجه گیری کلی

بر خلاف آنتی‌بیوتیک‌ها که به صورت ذاتی روی فرایند های خاصی از موجودات زنده اثر مخرب می‌گذارند و باعث بازداری از رشد آنها می‌شوند، به نظر می‌رسد ترکیبات فرار در دُز پایین که در طبیعت معمول است بیشتر به عنوان مولکول پیام عمل می‌کنند تا عامل بازدارنده رشد. البته استفاده از دُز بالای این ترکیبات باعث بازداری از رشد قارچ‌ها شده است و منابع موجود موید این واقعیت می‌باشد (Fernando *et al.*, 2005; Fiddaman & Rossall 1993; Herrington *et al.*, 1985). قابل ذکر است که در اکثر موارد این اثر به صورت قارچ ایستائی بوده است تا قارچ‌کشی (Liu *et al.*, 2008). برای اثبات نقش دَز بالا در کنترل قارچ‌ها، قارچ *B. cinerea* در معرض یک تشتک پتری که به صورت کامل با سویه GB03 تلقیح شده بود قرار گرفت.

1. Complex medium
2. Defined medium

در این تیمار دُز بالای ترکیبات فرار حاصل باعث بازداری کامل از رشد قارچ شد. این نتیجه موید این است که در دُز بالا ترکیبات فرار GB03 می‌توانند همانند آنتی‌بیوتیک‌ها عمل کرده و باعث مرگ قارچ شوند. به نظر می‌رسد قرار گرفتن قارچ در معرض غلظت‌های بالایی از ترکیبات فرار باعث تداخل در فیزیولوژی عمومی قارچ‌ها می‌شود یا به عبارتی نفوذ پذیری بالای این ترکیبات شیمیائی با وزن مولکولی کم به درون سلول‌های قارچ باعث ایجاد حالت سمیت می‌شوند. به عبارتی اثر اختصاصی نیست. البته قابل ذکر است که استفاده بیش از حد از هر ماده‌ای که در حالت عادی سمی نیست می‌تواند باعث تداخل آن در سیستم‌های زنده شود، چه آب را به عنوان خفیف‌ترین سم معرفی می‌کنند (Pedigo, 1999). در تبیین این فرضیه گزارش-هایی ذکر می‌شود که ترکیبات فرار می‌توانند به عنوان سیگنال مولکولی بین افراد یک گونه یا گونه های یک جمعیت عمل کنند. از جمله ارتباط بین گیاهان از طریق ترکیبات فرار برگ‌های سبز[1] (Pare *et al.*, 2005). یا ارتباط بین سلولی در *E. coli* که با استفاده از متابولیت فرار ایندول انجام می‌شود (Kai *et al.*, 2009). همچنین گیاهان با تولید ترکیبات فرار با حشرات پارازیتوئید ارتباط برقرار کرده و از آنها یاری می‌طلبند، این ترکیبات را ترکیبات فرار گیاهی القاء شده توسط گیاه‌خواران[2] می‌گویند (Kost & Heil, 2006). در برخی موارد سیگنال مورد استفاده در سیستم حد نصاب احساس[3] باکتری‌ها نیز یک نوع متابولیت فرار است (Kai *et al.*, 2009). از ترکیبات فراری که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفتند، دست کم در مورد متیل‌جاسمونات، متیل‌سالیسیلات، استوئین و بوتان دیول نقش آنها به عنوان مولکول سیگنال به اثبات رسیده است. در همه آن موارد از دُز پایین این ترکیبات استفاده شده است. لذا در مجموع می‌توان نتیجه گیری کرد که دُز پایین برخی ترکیبات فرار خاص می‌تواند به عنوان مولکول سیگنال روی فنولوژی و بیماری زایی قارچ از یک طرف و دفاع گیاه میزبان از طرف دیگر اثر داشته باشند. با توجه به محتمل بودن دُز های پایین در طبیعت به نظر می‌رسد مکانیسم اصلی بازدارندگی بیمارگر به وسیله ترکیبات فرار باسیلوس به علت ماهیت سیگنالی این ترکیبات در القاء مقاومت سیستمیک باشد تا بازداری مستقیم از رشد قارچ بیمارگر.

1. Green Leaf Volatiles (GLVs)
2. Herbivore-Induced Plant Volatiles (HIPVs)
3. Quorum Sensing (QS)

REFERENCES

1. Blom, D., Fabbri, C., Eber, L. & Weisskopf, L. (2011). volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. *Applied Environmental Microbiology*, 77, 1000–1008.
2. Cao, Z.Y., Yang, S.Y. & Dong, J.G. (2006). A review on relations between pathogenicity and melanin of plant fungi. *Microbiology*, 33, 154-158.
3. Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z. & Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters*, 30, 919–923.
4. Choi, H-K., Boyoung, L. & Ryu, C.M. (2012). An insect pheromone, 3-pentanol primes systemic resistance against plant pathogenic bacteria and virus in pepper and *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, under publication.
5. Choudhary, D.K., Johri, B.N. & Prakash, A. (2008). Volatiles as priming agent that initiate plant growth and defense responses. *Current Science*, 94, 595-604.
6. Defago, G., Berling, C.H., Burger, U., Haas, D., Kahr, G., Keel, C., Voisard, C., Wirthner, P. & Wiitrich, B. (1990). Suppression of black root rot of tobacco by a *Pseudomonas* strain: potential applications and mechanisms. In D Hornby (Ed.), *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. (pp. 93-108). CAB International.
7. Duponnois, R. & Kisa, M. (2006). The possible role of trehalose in the mycorrhiza helper bacterium effect. *Canadian Journal of Botany*, 84, 1005–1008.
8. Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R. & Piechulla B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 665-703.
9. Farag, M.A., Ryu, C.M., Summer, L.W. & Pare, P.W. (2006). GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67, 2262–2268.

10. Farmer, E.E., Ryan, C.A. (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 87, 7713-7716.
11. Fernando, D.W.G., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S. & Savchuk S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 955–964.
12. Fiddaman, D.J. & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 119-126.
13. Fujita, Y. (2009). Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73, 245–259.
14. Gu, Y-Q., Mo, M-H., Zhou, J.P., Zou, C-S. & Zhang, K-Q. (2007). Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2567–2575.
15. Herrington, P.R., Graig, J.T., Chea, C.Y. & Sheridan, J.E. (1985). Inhibition of spore germination of volatiles from *Streptomyces griseoruber*. *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 509–512.
16. Huang, Y., Xu, C., Ma, L., Zhang, K., Duan, C. & Mo, M. (2010). Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 417-22.
17. Insam, H. & Seewald, M.S.A. (2010). Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 46,199–213.
18. Kai, M. & Piechulla, B. (2009). Plant growth promotion due to rhizobacterial volatiles – An effect of CO2? *FEBS Letters*, 583, 3473–3477.
19. Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B. & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 1001–1013.
20. Kloepper, J.W., Ryu, C-M. & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94, 1259-1266.
21. Kost, C. & Heil, M. (2006). Herbivore-induced plant volatile induce an indirect defence in neighboring plants. *Journal of Ecology*, 94, 619–628.
22. Liu, W-W., Mu, W., Zhu, B-Y., Du, Y-C. & Liu, F. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in China*, 7(9), 1104-1114.
23. Maia. M.M.D., Morais, M.M.C., Morais, M.A., Melo, E.H.M. & Lima-Filho J.L. (1999). Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. *Revista de Microbiologia*, 30, 304-309
24. McCain, A.H. (1966). A volatile antibiotic by *Streptomyces griseus*. *Phytopathology*, 56,150.
25. Moore-Landecker, E. & Stotzky, G. (1973). Morphological abnormalities of fungi induced by volatile microbial metabolites. *Mycologia*, 65, 519–530.
26. O'Sullivan, D. & O'Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*, 56, 662–676.
27. Ongena, M. & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides versatile weapon for plant disease control. *Trends in Microbiology*, 16, 115–125.
28. Paré, P.W., Farag, M.A., Krishnamachari, V., Zhang, H., Ryu, C.M. & Kloepper, J.W. (2005). Elicitors and priming agents initiate plant defence responses. *Photosynthetic Research*, 85, 149–159.
29. Pedigo, L.P. (1999). *Entomology and Pest Management*, (6th. Ed.) Prentice Hall. New Jersey, 691pp.
30. Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S.C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5, 308–316.
31. Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Kunjeti, S.G., Donofrio, N.M., Czymmek, K.J., Paré, P.W. & Bais, H.P. (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Communicative & Integrative Biology*, 3, 130–138.
32. Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Kloepper, J.W. & Paré, P.W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134, 1017–1026.
33. Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wie, H.X., Pare, P.W. & Kloepper, J.W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 100, 4927–4932.
34. Schulz, S. & Dickschat, J.S. (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24, 814–842.
35. Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., AbuQamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R.A., Hirt, H. & Mengistea T. (2006). The membrane-anchored botrytis-induced kinase1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*, 18, 257–273.

36. Vespermann, A., Kai, M. & Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied Environmental Microbiology*, 73, 5639–5641.
37. Vlot, A.C., Klessig, D.F. & Park, S-W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 436–442.
38. Wheatley, R.E. (2002). The consequences of volatile organic compounds mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 357–364.
39. Zou, C-S., Mo, M-H., Gu, Y-Q., Zhou, J-P. & Zhang, K-Q. (2007). Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2371–2379.