University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 14, No. 2, Summer 2024 (169-181)
doi: 10.22124/CR.2024.27398.1821
pISSN: 2252-0163 eISSN: 2538-6115

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Investigating the effect of various biotic and abiotic inducers on wheat resistance to brown rust disease (*Puccinia triticina*)

Wahab Haji Hosseini[1], Valiollah Babaeizad[2*], Shahriyar Kia[3], and Milad Habibi Daronkolaei[4]

1. Graduate M.Sc., Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran ([*] Corresponding author: babaeizad@yahoo.com)
3. Research Assistant Professor, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran
4. Researcher, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Comprehensive abstract

Introduction

Wheat is one of the most important crop plants that provides food for more than 80% of the world's population. Wheat leaf or brown rust caused by *Puccinia triticina* is the most prevalent rust disease in wheat. One of the method of managing plant diseases such as wheat leaf rust is chemical control using fungicides, but this method has environmental risks. Therefore, utilizing beneficial microorganisms and environmentally-friendly chemical compounds is a sustainable strategy in the management of plant diseases. This method enhances plant resistance through induced resistance and reduces the damage caused by diseases. The objective of this study was to compare the effect of several biotic and abiotic inducers on the increase of induced resistance in wheat against leaf rust disease.

Materials and methods

The sensitive wheat variety, Karim, was used to perform this experiment. The seeds were disinfected with 1% sodium hypochloride and germinated on wet sterile filter paper. Germinated seeds were transferred to plastic pots containing sterile soil and the pots were placed in the greenhouse. The experiment was conducted in a completely randomized design with six treatments and three replications. The treatments were including *Trichoderma harzianum* (5×10^5 spores per ml), *Pseudomonas fluorescence* (with a concentration of 0.7), salicylic acid (with a concentration of 3 mM), potassium phosphite (with a concentration of 1 g/liter), chitosan (with a concentration of 400 ppm) and a positive control as check treatment. The studied treatment were sprayed on wheat seedlings at two-leaf stage. After 24 hours, the seedlings were infected with the disease-causing fungus with a concentration of 10^6 spores per ml using a fogger. The treated and control plants were sampled to measure the activity of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase enzymes at 0, 24, 48 and 72 hours after infection, and to evaluate the disease severity after 15 days. The SAS software was used for analysis of variance and comparison of means by Duncan's test at 5% probability level and Excel software was used to draw two-dimensional graphs.

Research findings

The results indicated that there was a significant difference in enzymes activity levels between the studied treatments and the control treatment. Potassium phosphite and *Pseudomonas fluorescens* treatments showed the highest increase in the activity level of superoxide dismutase, catalase and peroxidase enzymes immediately after the inoculation of *P. triticina* compared to control treatment. Furthermore, the three treatments of *P. fluorescens*, chitosan and potassium phosphite at 24 and 48

hours and the three treatments of *P. fluorescens* and *T. harzianum* and chitosan at 72 hours after the inoculation of *P. triticina* had the highest increase in activity of superoxide dismutase, catalase and peroxidase enzymes compared to the control treatment. The results showed that there was a significant difference in disease spread in 15 days after the inoculation of *P. triticina* between the control treatment and other treatments. The disease symptoms in potassium phosphite, *P. fluorescens*, chitosan, *T. harzianum* and salicylic acid treatments decreased by 22.38%, 40.29%, 44.77%, 52.23% and 58.20% compared to the control treatment, respectively.

Conclusion

The results of this study showed that biotic inducers such as *T. harzianum* fungus and *P. fluorescens* bacteria and abiotic inducers such as salicylic acid, chitosan and potassium phosphite had a significant effect on the control of wheat leaf rust disease in greenhouse conditions. It seems that a part of the pathogenic process of *P. triticina* fungus in wheat plants is due to decrease in the levels of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase enzymes, which leads to the breaking of inherent resistance in the plant and the appearance of disease symptoms. It can be concluded that biotic and abiotic inducers can increase the level of catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes in diseased plants, and reduce the number of brown rust leaf spots. Therefore, these inducers may be a suitable alternative for chemical compounds in the future.

Keywords: Antioxidant enzymes, Sustainable strategy, Wheat leaf rust

Received: May 6, 2024 Accepted: July 14, 2024

Cite this article:

Haji Hosseini, W., Babaeizad, V., Kia, S., & Habibi Daronkolaei, M. (2024). Investigating the effect of various biotic and abiotic inducers on wheat resistance to brown rust disease (*Puccinia triticina*). *Cereal Research*, *14*(2), 169-181. doi: 10.22124/CR.2024.27398.1821.

تحقیقات غلات
دوره چهاردهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۳ (۱۸۱-۱۶۹)
doi: 10.22124/CR.2024.27398.1821
مقاله پژوهشی
دسترسی آزاد

بررسی تأثیر چند القاکننده زیستی و غیر زیستی بر مقاومت گندم به بیماری زنگ قهوه‌ای (*Puccinia triticina*)

وهاب حاجی حسینی[۱]، ولی‌اله بابایی‌زاد[۲*]، شهریار کیا[۳]، میلاد حبیبی درونکلایی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران (* نویسنده مسئول: babaeizad@yahoo.com)
۳- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
۴- محقق، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

چکیده جامع

مقدمه: گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که ماده غذایی بیش از ۸۰ درصد از جمعیت جهان را تأمین می‌کند. زنگ برگ یا زنگ قهوه‌ای گندم که توسط *Puccinia triticina* ایجاد می‌شود، شایع‌ترین بیماری زنگ در گندم است. یکی از روش‌های مدیریت بیماری‌های گیاهی نظیر زنگ برگ گندم، مبارزه شیمیایی با استفاده از قارچ‌کش است، اما این روش مبارزه خطرات زیست‌محیطی به‌همراه دارد. از این‌رو، استفاده از ریزجانداران مفید و ترکیبات شیمیایی که سازگار با محیط زیست، یک راه‌کار پایدار در مدیریت بیماری‌های گیاهی است که از طریق ایجاد مقاومت القایی، باعث افزایش مقاومت در گیاه و در نتیجه کاهش خسارت ناشی از بیماری‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه‌ای تأثیر چند القاکننده زیستی و غیر زیستی بر افزایش مقاومت القایی در گندم در برابر بیماری زنگ برگ بود.

مواد و روش‌ها: از گندم رقم حساس کریم برای اجرای این آزمایش استفاده شد. بذرهای این رقم، پس از ضد عفونی با هیپوکلرید سدیم یک درصد، روی کاغذ صافی استریل مرطوب، جوانه‌دار و سپس به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک استریل منتقل و گلدان‌ها در گلخانه قرار داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار *Trichoderma harzianum* Rifai (با غلظت ۵×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر)، *Pseudomonas fluorescence* (با غلظت ۰/۷)، سالیسیلیک اسید (با غلظت سه میلی‌مولار)، فسفیت پتاسیم (با غلظت یک گرم بر لیتر)، کیتوزان (با غلظت ppm ۴۰۰) و کنترل مثبت (شاهد) در سه تکرار انجام شد. تیمارها در مرحله دو برگی روی گیاهچه‌های گندم اسپری شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت، گیاهچه‌ها به قارچ عامل بیماری با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از مه‌پاش آلوده شدند. نمونه‌برداری از گیاهان برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی و یاداشت‌برداری برای ارزیابی شدت بیماری پس از ۱۵ روز انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام و نمودارهای مورد نظر با نرم‌افزار Excel رسم شدند.

یافته‌های تحقیق: نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد مطالعه و تیمار شاهد از نظر فعالیت آنزیمی وجود داشت. دو تیمار فسفیت پتاسیم و *P. fluorescens* بلافاصله پس از مایه‌زنی قارچ *P. triticina*، بیش‌ترین افزایش سطح

فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. علاوه بر این، سه تیمار *P. fluorescens*، کیتوزان و فسفیت پتاسیم در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت و سه تیمار *P. fluorescens*، *T. harzianum* و کیتوزان در بازه زمانی ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی دارای بالاترین سطح افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز نسبت به تیمار شاهد بودند. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان گسترش بیماری در ۱۵ روز پس از مایه‌زنی قارچ *P. triticina* میان تیمار شاهد و سایر تیمارها وجود داشت و میزان علایم بیماری در تیمارهای فسفیت پتاسیم، *P. fluorescens*، کیتوزان، *T. harzianum* و سالیسیلیک اسید به‌ترتیب ۲۲/۳۸، ۴۰/۲۹، ۴۴/۷۷، ۵۲/۲۳ و ۵۸/۲۰ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که عوامل زیستی نظیر قارچ *T. harzianum* و باکتری *P. fluorescens* و عوامل غیرزیستی نظیر سالیسیلیک اسید، کیتوزان و فسفیت پتاسیم، تاثیر معنی‌داری در کنترل بیماری زنگ برگ گندم در شرایط گلخانه داشتند. به‌نظر می‌رسد که بخشی از روند بیماری‌زایی قارچ *P. triticina* در گیاه گندم به‌دلیل کاهش سطح آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز است که منجر به شکست مقاومت ذاتی در گیاه شده و علایم بیماری ظاهر می‌شود. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که القاکننده‌های زیستی و غیرزیستی می‌توانند سطح آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در گیاهان بیمار افزایش و در نتیجه تعداد لکه‌های برگی زنگ قهوه‌ای را کاهش دهند. از این‌رو، ممکن است این القاکننده‌ها در آینده جایگزین مناسبی برای ترکیبات شیمیایی باشند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، راه‌کار پایدار، زنگ برگ گندم

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۲۴

نحوه استناد به این مقاله:

حاجی حسینی، وهاب، بابایی‌زاد، ولی‌اله، کیا، شهریار، و حبیبی درونکلایی، میلاد. (۱۴۰۳). بررسی تأثیر چند القاکننده زیستی و غیرزیستی بر مقاومت گندم به بیماری زنگ قهوه‌ای (*Puccinia triticina*). *تحقیقات غلات*، ۱۴(۲)، ۱۸۱-۱۶۹.
doi: 10.22124/CR.2024.27398.1821

مقدمه

در سطح جهانی تعداد افرادی که در رژیم غذایی خود از گندم استفاده می‌کنند به چندین میلیارد نفر می‌رسد (Dinu *et al*., 2018). به‌طور متوسط سالانه حدود ۲۰ درصد از تولید جهانی گندم به‌دلیل بیماری‌ها و آفات از بین می‌رود (Singh *et al*., 2023). بیمارگرهایی مانند زنگ‌ها، لکه برگی‌ها، سفیدک پودری و فوزاریوم در بین مهم‌ترین بیمارگرهای قارچی گندم قرار دارند (Serfling *et al*., 2017). اپیدمی‌هایی که منجر به کاهش عملکرد در اثر این عوامل بیماری‌زا می‌شود، گزارش شده است. زنگ برگ یا قهوه‌ای گندم که توسط قارچ *Puccinia triticina* Erikss. ایجاد می‌شود، شایع‌ترین بیماری زنگ در گندم است. زنگ برگ در مناطقی از جهان بیش‌تر از زنگ ساقه گندم (*P. graminis* f. sp. *tritici* Erikss & Henning) و زنگ نواری گندم (*P. striiformis* f. sp. *tritici* Erikss) رخ می‌دهد (Kolmer, 2013). این بیماری در ایران ابتدا در سال ۱۹۸۴ میلادی گزارش شد (Esfandiari, 1948). در حال حاضر اهمیت اقتصادی زنگ قهوه‌ای در ایران بیش‌تر از زنگ سیاه و کم‌تر از زنگ زرد است، اما پراکندگی آن از زنگ زرد بیش‌تر است. این بیماری در تمام مناطق ایران به‌ویژه نواحی غرب، شمال غرب، خوزستان و قسمت‌هایی از خراسان و گرگان مشاهده و گزارش شده است (Bamdadian, 1993). کاهش عملکرد ناشی از آلودگی قارچ *P. triticina* معمولاً به‌دلیل کاهش تعداد دانه در سنبله و وزن دانه است (Bolton *et al*., 2008).

یکی از راه‌ها برای جلوگیری از کاهش تولید محصولات کشاورزی استفاده از قارچ‌کش‌ها است. با این حال، استفاده مداوم از قارچ‌کش‌ها باعث مقاومت یا تحمل قارچ‌ها به قارچ‌کش‌ها می‌شود (O'Brien, 2017). از طرفی دیگر استفاده از قارچ‌کش‌ها خطراتی برای محیط زیست و انسان دارد (Bryson & Brix, 2018). از این‌رو استفاده از ریزجانداران مفید یک راه‌کار پایدار در کنترل بیماری‌های مختلف است که باعث فعال شدن سیستم ایمنی گیاه تحت مقاومت القایی (Induced Resistance; IR) می‌شود و در نتیجه مقاومت گیاه را افزایش می‌دهد (Newman *et al*., 2013). فرایندهای مولکولی مرتبط با IR متنوع است و به نوع میکروب و سیستم گیاه پاتوژن بستگی دارد (Pieterse *et al*., 2014). همچنین یک روش جدید در مدیریت یکپارچه محصولات استفاده از ترکیبات شیمیایی است که با محیط زیست سازگار بوده و مقاومت به بیماری را از طریق IR تقویت می‌کند (Du Jardin, 2015). این ترکیبات با تأثیر مستقیم (ممانعت رشد میسیلیوم و کاهش تغییرات متابولیسمی) و غیر مستقیم (تحریک مکانیسم‌های دفاعی مانند تولید فیتوالکسین‌ها، گونه‌های اکسیژن فعال، القای پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و تقویت دیواره سلولی) روی پاتوژن و تنش‌های زیستی و غیرزیستی اثر می‌گذارند (Lim *et al*., 2013). هدف از مطالعه حاضر، بررسی مقایسه‌ای تأثیر ریزجانداران *Trichoderma harzianum* Rifai و *Pseudomonas fluorescens* و ترکیبات شیمیایی (اسید سالیسیلیک، کیتوزان و فسفیت پتاسیم) بر افزایش مقاومت القایی گیاه گندم در برابر بیماری زنگ برگ یا قهوه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

تیمارها و طرح آزمایش

برای بررسی تأثیر القاکننده‌های زیستی و غیرزیستی بر افزایش مقاومت گندم آلوده به قارچ *P. triticina* از طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار *T. harzianum*، *P. fluorescence*، اسید سالیسیلیک، کیتوزان، فسفیت پتاسیم و شاهد در سه تکرار استفاده شد.

کشت گیاهچه‌های همسان

بذر گندم رقم حساس کریم از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان تهیه شد. به‌منظور تولید گیاهچه‌های همسان و عاری از عوامل بیماری‌زا، بذرها ابتدا به‌مدت یک دقیقه با اتانول ۷۰ درصد و سپس با آب مقطر شستشو و سپس ۳۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم تجاری یک درصد قرار گرفتند و سه بار با آب مقطر شستشو شدند. دانه‌های ضدعفونی شده گندم روی کاغذ صافی استریل مرطوب در ظروف پتری سترون قرار گرفتند تا جوانه‌دار شوند. بذرهای جوانه‌دار به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک استریل منتقل شدند و گلدان‌ها در گلخانه نیمه کنترل شده با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس در طول روز، ۲±۲۲ درجه در طول شب و رطوبت نسبی ۶۰ درصد قرار گرفتند.

تیمار گیاهچه‌ها با *T. harzianum*

قارچ *T. harzianum* از گروه گیاه پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و در محیط

سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA)، کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از رشد کافی پرگنه قارچ، با خراش دادن سطح محیط اسپورها جمع‌آوری و در آب و توئین ۲۰ با استفاده از ورتکس مخلوط شدند. سوسپانسیون اسپور حاصل (۵×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر) روی بوته‌های دو برگی اسپری شد (Yadav *et al*., 2019).

تیمار گیاهچه‌ها با *P. fluorescence*

باکتری *P. fluorescence* از گروه گیاه پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و پس از کشت آن به‌مدت یک تا دو روز روز در محیط کشت نوترینت آگار، سوسپانسیونی با غلظت ۰/۷ (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) تهیه و روی بوته‌های دو برگی اسپری شد (Ashrafi *et al*., 2020).

تیمار گیاهچه‌ها با سالیسیلیک اسید

ابتدا ۰/۳ گرم اسید سالیسیلیک (شرکت Merck) در ۲۰ میلی لیتر اتانول ۹۹ درصد حل شد و سپس حجم آن با آب مقطر به ۱۸۰ میلی لیتر رسید و روی بوته‌های دو برگی اسپری شد (Valadi *et al*., 2013).

تیمار گیاهچه‌ها با فسفیت پتاسیم

جهت تهیه محلول فسفیت پتاسیم، ابتدا ۰/۵ گرم اسید فسفرو (H_3PO_3) (شرکت Sharlou) و ۰/۵ گرم هیدروکسید پتاسیم (شرکت Merck) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس اسیدیته آن با محلول KOH، روی ۶/۵ تنظیم و روی بوته‌های دو برگی اسپری شد (Mohammadi *et al*., 2019).

تیمار گیاهچه‌ها با کیتوزان

پودر کیتوزان (شرکت Sigma) به نسبت یک در هزار در اسید استیک حل شد و پس از آنکه اسیدیته آن به ۷ رسید، روی بوته‌های دو برگی اسپری شد (Valadi *et al*., 2013).

تلقیح عامل بیماری به گیاه

بذر گندم رقم حساس بولانی داخل گلدان‌های حاوی خاک استریل کشت شد. پس از سبز شدن بوته‌ها و ظهور برگ اول، یوریدیوسپورهای قارچ عامل زنگ قهوه‌ای *P. triticina* (تهیه شده از واحد بیماری‌شناسی غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) در محلول آب مقطر استریل و روغن توین ۲۰ به نسبت ۰/۰۵ درصد حل شد. سوسپانسیون اسپور حاصل روی برگ‌ها مایه‌زنی و با پوشش پلاستیکی پوشانده شد و گلدان‌ها در داخل گلخانه در دمای $۲۴ \pm ۲\ ^{\circ}C$ قرار داده شدند. اسپورها از روز ۱۲ تا ۱۵ پس از مایه‌زنی، هر سه روز یک‌بار، از روی برگ‌های گندم جمع‌آوری و پس از اینکه سوسپانسیون اسپوری با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر به‌دست آمد، روی گیاهچه‌های تیمار شده گندم پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از مه‌پاش به‌طور یکنواخت اسپری شد.

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از بافت برگی به‌ترتیب در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با قارچ *P. triticina* انجام شد.

استخراج عصاره برگی جهت مطالعه فعالیت آنزیم‌ها

ابتدا نمونه‌ها در ازت مایع پودر شدند. سپس ۰/۱ گرم بافت پودر شده با ۱/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= ۶/۸) با استفاده از دستگاه ورتکس به‌خوبی مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و فاز بالایی به‌عنوان عصاره جدا شد (Reuveni, 2017).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر به‌مدت دو دقیقه ثبت شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ mM با pH = ۷، گایاکول ۲۰ mM، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۲ mM و عصاره آنزیمی بود (Lück, 1965).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

۲۵ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۵ میلی‌مولار H_2O_2 مخلوط و تغییرات جذب آن‌ها به‌مدت دو دقیقه با استفاده از اسپکترفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد (Elavarthi & Martin, 2010).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (حاوی EDTA ۱/۵ میلی‌مولار، متیونین ۱۰ میلی‌مولار و نیتروبلو تترازولیوم‌کلراید ۷۵ میکرومولار) با ۱۰۰ میکرولیتر ریبوفلاوین یک میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره

آنزیمی مخلوط شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۵ دقیقه در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵ وات به فاصله ۳۵ سانتی‌متر قرار داده شدند و سپس لامپ خاموش و تغییرات جذب مخلوط واکنش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد (Paoletti *et al*., 1986).

ارزیابی علائم بیماری

درصد سطح برگ هر گیاه با علائم مشخصه‌ای مانند زنگ‌زدگی، تغییر رنگ یا نکروز توسط نرم افزار ImageJ ارزیابی شد. پانزده روز بعد از مایه‌زنی نیز تعداد جوش‌های ظاهر شده روی برگ‌ها در تیمارهای مختلف و شاهد، شمارش و ثبت شد (Peterson *et al*., 1948).

محاسبات آماری

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. نمودارهای مورد نظر نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

تغییرات فعالیت آنزیم‌ها در تیمار فسفیت پتاسیم

نتایج نشان داد که سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌تدریج افزایش یافت، به‌طوری که بیش‌ترین میزان این آنزیم در ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ *P. triticina* (افزایش ۳۱۴/۱۴ درصدی نسبت به تیمار شاهد) مشاهده شد (شکل ۱-A). شرایط برای آنزیم کاتالاز کمی متفاوت بود، به‌طوری که سطح آنزیم کاتالاز در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ *P. triticina* در تیمار فسفیت پتاسیم به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۸/۶۰، ۱۸/۰۸، ۱۷/۰۷ و ۷/۵۹ درصدی در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد (شکل ۱- B). سطح آنزیم پراکسیداز در تیمار فسفیت پتاسیم در گیاهچه‌های گندم در زمان صفر در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت و تفاوت‌ها از ۲۴ ساعت به بعد مشاهده شد، به‌طوری که سطح پراکسیداز اندازه‌گیری شده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در تیمار فسفیت پتاسیم به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۵۷/۲۷، ۲۸/۵۶ و ۱۲/۰۴ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل ۱-C).

بر اساس مطالعات پیشین، استفاده از پتاسیم در گیاه *Sedum rubotinctum* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز و کاهش تشکیل ROS در سلول‌های گیاهی شد (Liang *et al*., 2007). همچنین، KNO_3 باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در گندم تحت تنش شوری شد (Zheng *et al*., 2008). نتایج مطالعه دیگری نشان داد که K_2HPO_4 رشد میسلیوم قارچ *P. triticina* را مهار می‌کند و در کنترل قارچ‌های *P. tritici* و *Uromyces appendiculatus* نیز مؤثر است (Arslan, 2015). می‌توان گفت که فسفیت پتاسیم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها و به دنبال آن کاهش تشکیل ROS در سلول‌های گیاهی شده و بنابراین در گیاهان تیمار شده با فسفیت پتاسیم از توسعه بیماری در سلول‌های میزبان جلوگیری و باعث ایجاد مقاومت در گیاه می‌شود.

میزان فعالیت آنزیم‌ها در تیمار کیتوزان

سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار کیتوزان در همه زمان‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت و پس از گذشت ۷۲ ساعت از مایه‌زنی قارچ، بیش‌تر از زمان‌های قبلی بود، به‌طوری که افزایش ۲۲۸/۵۷ درصدی را نشان داد (شکل ۱-D). سطح آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شده در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی در تیمار کیتوزان در مقایسه با تیمار شاهد به‌ترتیب افزایش معنی‌دار ۲۳/۲۹، ۱۹/۳۷، ۹/۷۵ و ۵/۷۵ درصدی داشت (شکل ۱-E). سطح آنزیم پراکسیداز نیز در تیمار کیتوزان در زمان‌های صفر و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ *P. triticina* به‌ترتیب افزایش ۸۶/۱۸ و ۸۶/۸۵ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل ۱-F).

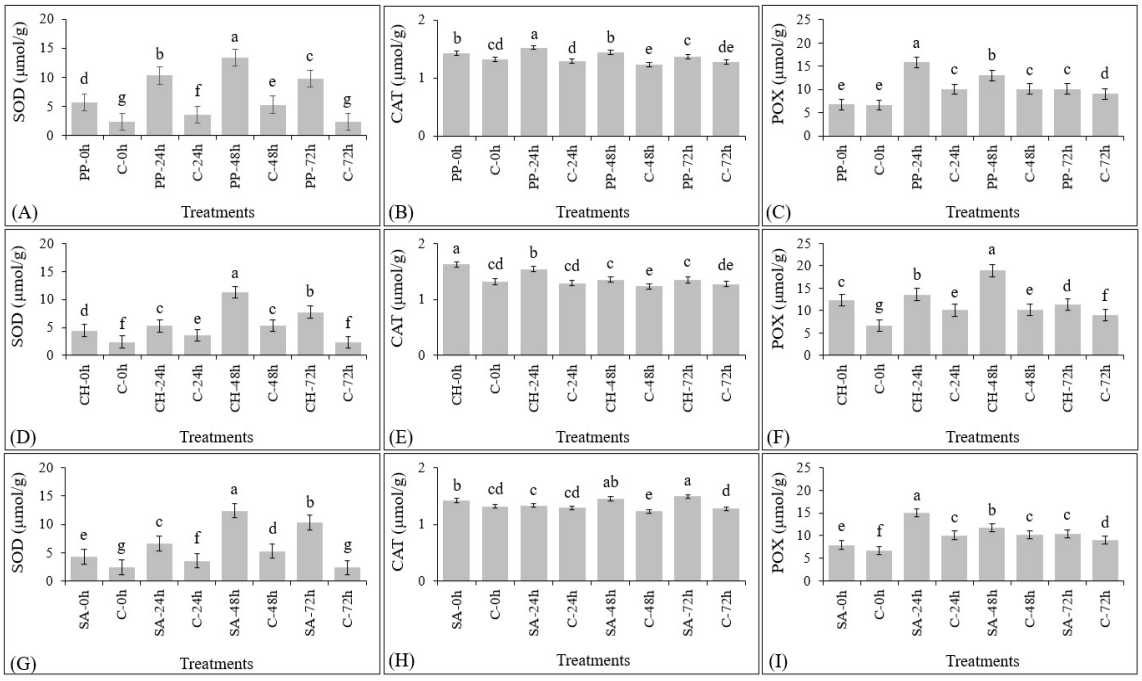
هانگلیان و همکاران (Honglian *et al*., 2003) نشان دادند که تیمار الیگوکیتوزان باعث افزایش القای آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در برگ گیاه پنبه می‌شود. الیگوکیتوزان سطوح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را در مقایسه با تیمار شاهد در گیاه کلزا نیز افزایش داد (Yin *et al*., 2008). پیشرفت قارچ *P. triticina* در گندم‌های تیمار شده با نانو ذرات کیتوزان و اسید سالیسیلیک، بررسی و مشاهده شد که در گندم‌های تیمار شده، یورودینیوسپورهای *P. triticina* شکل خود را از دست دادند و آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز، ضخامت بافت مزوفیل، اپیدرم تحتانی و فوقانی و سطح رونویسی ژن‌های *PR1*، *PR5* و *PR10* افزایش و در نتیجه میزان بیماری کاهش یافت (Elsharkawy *et al*., 2022). در آزمایش حاضر نیز سطح فعالیت آنزیم‌ها به‌طور

قابل توجهی در گندم تیمار شده با کیتوزان نسبت به شاهد بالاتر بود. این نتیجه نشان می‌دهد که کیتوزان باعث می‌شود گیاه پس از دریافت اولین سیگنال حمله بیمارگر، شروع به آزادسازی آنزیم‌ها کرده و از پیشرفت قارچ جلوگیری کند.

میزان فعالیت آنزیم‌ها در تیمار اسید سالیسیلیک

میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهچه‌های گندم تیمار شده با اسید سالسیلیک از زمان صفر تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ *P. triticina* افزایشی بود (شکل ۱-G). در مقابل، تأثیر اسید سالسیلیک بر میزان آنزیم کاتالاز از زمان صفر تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری متغیر بود، به‌طوری که سطح کاتالاز در زمان صفر ۷/۵۹ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت، در حالی‌که تفاوت معنی‌داری پس از ۲۴ ساعت مشاهده نشد. با این وجود، پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، سطح آنزیم کاتالاز به‌ترتیب افزایش ۱۷/۸۸ و ۱۷/۰۱ درصدی نسبت به تیمار شاهد داشت (شکل ۱-H). سطح آنزیم پراکسیداز نیز در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود و بیش‌ترین میزان آن پس از ۴۸ ساعت مشاهده شد (شکل ۱-I).

کرامپتون و همکاران (Crampton *et al*., 2009) گزارش دادند که اسید سالسیلیک باعث افزایش مقاومت گیاه ارزن در مقابل قارچ *P. substriata* شد. اسید سالیسیلیک چرخه داخلی گلوتاتیون را تقویت می‌کند و آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند کاتالاز، آسکوربات، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و سیستم‌های سم‌زدایی فلزات را افزایش می‌دهد (Vlot *et al*., 2009; Arif *et al*., 2020; Koo *et al*., 2020). علاوه بر تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اسید سالیسیلیک باعث تجمع پرولین برای غلبه بر تنش می‌شود (Wani *et al*., 2017). در این تحقیق نیز میزان فعالیت آنزیم‌ها در گیاهان تیمار شده با اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشت و نشان داد که اسید سالیسیلیک باعث افزایش آنزیم‌ها در گیاه در مقابله با قارچ *P. triticina* می‌شود و از رشد قارچ جلوگیری می‌کند.



شکل ۱- تغییرات سطوح فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) در بازه‌های زمانی مختلف تحت تاثیر تیمارهای فسفیت پتاسیم (PP)، کیتوزان (CH) و اسید سالسیلیک (SA) در مقایسه با شاهد (C). ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشابه، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 1. Changes in the activity levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POX) enzymes at different time periods affected by potassium phosphite (PP), chitosan (CH) and salicylic acid (SA) treatments compared to the control (C). Columns with at least one similar letter are not significantly different.

میزان فعالیت آنزیم‌ها در تیمار *T. harzianum*

سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* در تمامی زمان‌ها در مقایسه با تیمار شاهد معنی‌دار بود و بیش‌ترین میزان آن پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۲-A). سطح آنزیم کاتالاز نیز افزایش یافت و تفاوت آن با تیمار شاهد معنی‌دار بود (شکل ۲-B). سطح آنزیم پراکسیداز بلافاصله پس از مایه‌زنی با قارچ *P. triticina* به‌طور معنی‌داری (۴۰/۶۵ درصد) نسبت به شاهد افزایش یافت، اما این اختلاف در ۷۲ ساعت غیر معنی‌دار بود (شکل ۲-C).

گونه‌های تریکودرما به‌طور موضعی و سیستمیک عمل می‌کنند و باعث سیگنالینگ، فعال‌سازی و تجمع ترکیبات ضدمیکروبی مربوط به دفاع گیاهی می‌شوند که شامل آنزیم‌هایی مانند فنیل آمونیاک لیاز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و لیپوکسیژناز، پروتئین‌های PR (پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی)، ترپنوئید، ریشیتین، لوبیمین، فیتوتوبرول، کومارین، سولوتیوون، رسوراتول و آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند اسید اسکوربیک، گلوتاتیون و غیره است (Zeilinger & Omann, 2007; Brotman *et al*., 2010). در مطالعه‌ای اثر دو گونه *T. harzianum* و *T. viride* روی قارچ *P. graminis* f.sp.*tritici* در دو شرایط مزرعه‌ای و آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هنگام استفاده از سوسپانسیون گونه‌های تریکودرما به‌ویژه به‌صورت ترکیبی، اوریدوسپورهای قارچ *P. graminis* f.sp.*tritici* مهار شدند و در شرایط مزرعه نه تنها باعث کاهش بیماری شد، بلکه محتوای فنل، فعالیت آنزیم پراکسیداز و پارامترهای رشد گندم را نیز افزایش داد (Afzal *et al*., 2022). در این بررسی مشاهده شد که فعالیت آنزیم‌ها در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد بیش‌تر بود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که پتانسیل فعالیت آنزیم‌ها در گندم‌های تیمار شده بیش‌تر است، به‌طوری که فعالیت آن‌ها در هنگام آلودگی به بیماری افزایش می‌یابد و منجر به تحمل به بیماری می‌شود.

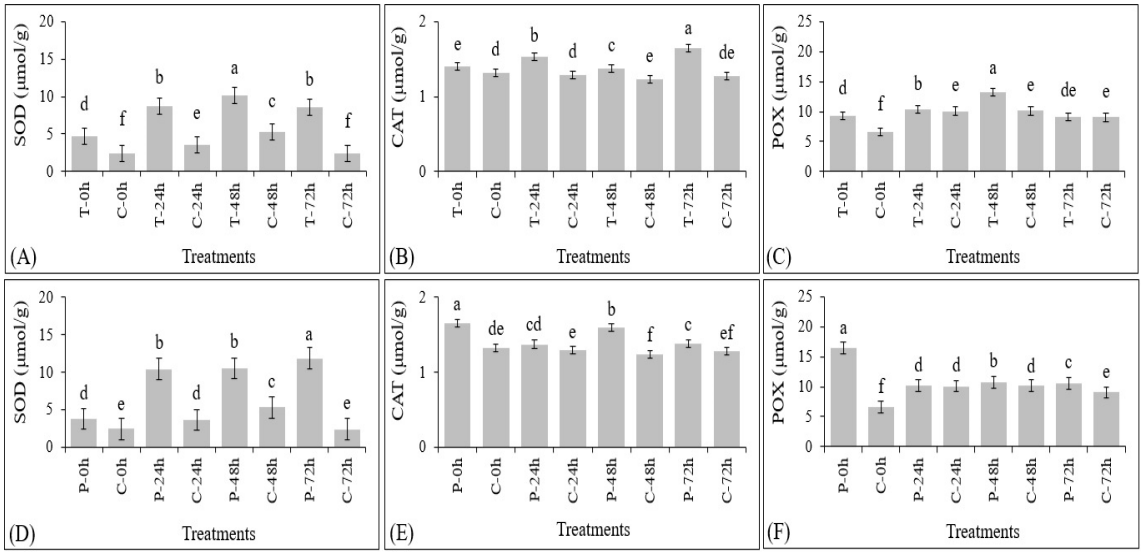
تغییرات فعالیت آنزیم‌ها در تیمار *P. fluorescens* پس از آلودگی با قارچ *P. triticina*

سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهچه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد در تمامی زمان‌ها بیش‌تر و تفاوت آن معنی‌دار بود (شکل ۲-D). سطح آنزیم کاتالاز نیز در گیاهچه‌های تیمار شده با باکتری در تمامی زمان‌های مطالعه شده پس از مایه‌زنی قارچ *P. triticina* بیش‌تر و تفاوت آن با شاهد معنی‌دار بود (شکل ۲-E). تفاوت سطح آنزیم پراکسیداز نیز در گیاهچه‌های تیمار شده با باکتری *P. fluorescens* در مقایسه با شاهد در زمان صفر معنی‌دار بود و افزایش ۱۴۸/۵۴ درصدی را نشان داد، ولی در زمان‌های بعدی تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار مشاهده نشد (شکل ۲-F).

نتایج آزمایشی در گوجه فرنگی نشان داد که تیمار با باکتری *P. fluorescens*، تهاجم قارچ *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* را به‌دلیل افزایش آنزیم‌های دفاعی مانند فنیل‌آلانین آمونیالیاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز، کاتالاز، بتا ۱و ۳ گلوکاناز و سوپراکسید دیسموتاز به‌تأخیر می‌اندازد (Manikandan & Raguchander, 2014). در مطالعه دیگری مشاهده شد که اثر تنش خشکی در گیاهان بامیه تیمار شده با باکتری *P. fluorescens*، به‌دلیل افزایش متابولیت‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند فنولیک‌ها، آسکوربات و گلوتاتیون و آنزیم‌های مهارکننده گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایکل پراکسیداز، کاهش یافت (Pravisya *et al*., 2019). در آزمایش حاضر نیز میزان آنزیم‌ها در گندم‌های تیمار شده با باکتری پس از مایه‌زنی با *P. triticin* افزایش یافت و باعث محدود کردن پاتوژن شد.

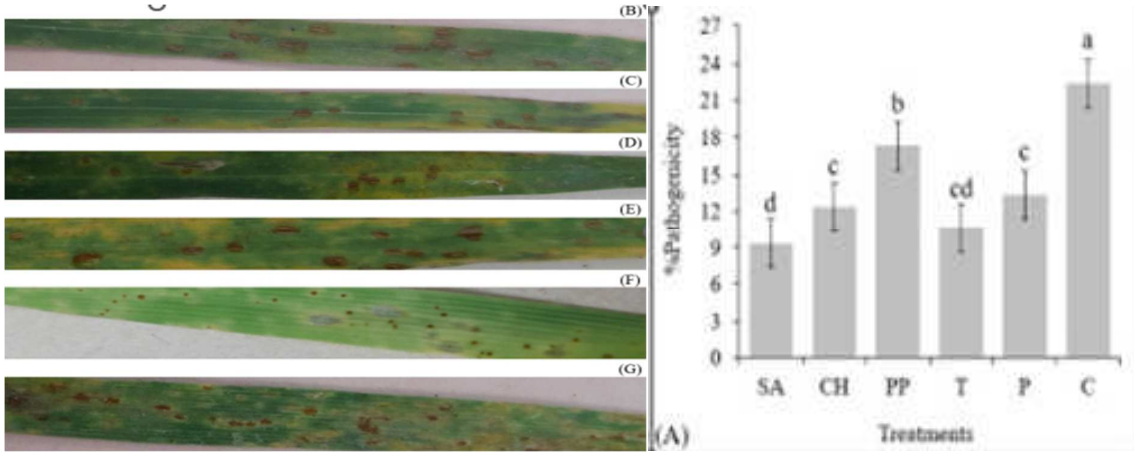
شدت بروز علائم بیماری

بررسی شدت بروز علائم بیماری زنگ برگ در گیاهچه‌های گندم ۱۵ روز پس از مایه‌زنی با اسپورهای قارچ *P. triticina* تفاوت معنی‌دار بین تیمارها را نشان داد. تیمار شاهد بیش‌ترین علائم بیماری را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. علائم بیماری در تیمار فسفیت پتاسیم به‌طور معنی‌داری (۲۲/۳۸ درصد) در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. تیمارهای *P. fluorescens*، کیتوزان و قارچ *T. harzianum* تفاوت معنی‌داری با یک‌دیگر نداشتند، اما در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری (۴۰/۲۹، ۴۴/۷۷ و ۵۲/۲۳ درصد) علائم بیماری را کاهش دادند. بیش‌ترین اختلاف معنی‌دار در میزان بروز علائم بیماری زنگ برگ بین تیمار اسید سالسیلیک و تیمار شاهد مشاهده شد، به‌طوری که میزان علائم بیماری در این تیمار ۵۸/۲۰ درصد کم‌تر از تیمار شاهد بود (شکل ۳).



شکل ۲- تغییرات سطوح فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POX) در بازه‌های زمانی مختلف تحت تاثیر تیمارهای *T. harzianum* (T) و *P. fluorescens* (P) در مقایسه با شاهد (C). ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشابه تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Figure 2. Changes in the activity levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POX) enzymes at different time periods affected by *T. harzianum* (T) and *P. fluorescens* (P) treatments compared to the control (C). Columns with at least one similar letter are not significantly different.



شکل ۳- علائم بیماری زنگ قهوه‌ای در تیمارهای مختلف ۱۵ روز پس از مایه‌زنی با قارچ *P. triticina*. A) مقایسه میانگین درصد بیماری بین تیمارهای اسید سالسیلیک (SA)، کیتوزان (CH)، فسفیت پتاسیم (PP)، قارچ *T. harzianum* (T)، باکتری *P. fluorescens* (P) و شاهد (C) (ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشابه تفاوت معنی‌داری ندارند)؛ B) علائم ایجاد شده در تیمار باکتری *P. fluorescens*؛ C) علائم ایجاد شده در تیمار اسید سالسیلیک؛ D) علائم ایجاد شده در تیمار قارچ *T. harzianum*؛ E) علائم ایجاد شده در تیمار کیتوزان؛ F) علائم ایجاد شده در تیمار فسفیت پتاسیم؛ G) علائم ایجاد شده در تیمار شاهد.

Figure 3. Brown rust disease symptoms in different treatments 15 days after inoculation with *P. triticina*. A) Comparison of means of disease percentage between salicylic acid (SA), chitosan (CH), potassium phosphite (PP), *T. harzianum* (T), *P. fluorescens* (P) and control (C) treatments (Columns with at least one similar letter are not significantly different); B) Symptoms caused by *P. fluorescens* treatment; C) Symptoms caused by salicylic acid treatment; D) Symptoms caused by *T. harzianum* fungus treatment; E) Symptoms caused by chitosan treatment; F) Symptoms caused by potassium phosphite treatment; G) Symptoms caused by control treatment.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه میزبان برای مقابله با قارچ بیمارگر *P. triticina*، تولید آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را افزایش می‌دهد و از این طریق پیشرفت بیماری را کند می‌کند. همچنین کاربرد ریزجانداران *T. harzianum* و *P. fluorescens* و ترکیبات اسید سالیسیلیک، کیتوزان و فسفیت پتاسیم توانست به‌طور معنی‌داری سطح آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش دهد و در نتیجه باعث ایجاد مقاومت در گیاه گندم شد و تعداد لکه‌های برگی زنگ قهوه‌ای را کاهش داد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که قارچ *T. harzianum*، باکتری *P. fluorescens* و عوامل غیر زیستی نظیر اسید سالسیلیک، کیتوزان و فسفیت پتاسیم، تاثیر خوبی در کنترل این بیماری در شرایط گلخانه داشتند و از این‌رو ممکن است این القا کننده‌ها در آینده جایگزین مناسبی برای ترکیبات شیمیایی باشند.

تضاد منافع

نویسندگان تایید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هرگونه روابط تجاری یا مالی می‌تواند به عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

رعایت اخلاق در نشر

نویسندگان اعلام می‌کنند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تاکنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده است و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

اجازه انتشار مقاله

نویسندگان با چاپ این مقاله به‌صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.

References

Afzal, S., Haroon, A., Hussain, M. A., Bashir, M. A., Atta, S., Bashir, S., & Bodlah, M. A. (2022). Potential of *Trichoderma* isolates to control plant pathogen, leaf rust on different commercial wheat varieties / genotypes. In: Ansari, M.-R. (Ed.). Wheat. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.106387.

Arif, Y., Sami, F., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: A study towards physiology and signal transduction under challenging environment. *Environmental & Experimental Botany*, *175*, 104040. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104040.

Arslan, U. (2015). Evaluation of antifungal activity of mono and dipotassium phosphates against phytopathogenic fungi. *Fresenius Environmental Bulletin*, *24*(3), 810-816.

Ashrafi, J., Rahnama, K., Babaeizad, V., Ramezanpour, S. S., & Keel, C. (2020). The effect of *Pseudomonas protegens* CHA0 and an endophyte fungus *Serendipita indica* on resistance induction with defense genes expression of wheat against *Septoria* leaf blotch disease. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *56*(3), 275-301. [In Persian]. doi: 10.22034/ijpp.2020.241964.

Bamdadian, A. (1993). Evaluation of physiological race of rusts of grass and their modification in Iran. Institute of Evaluation Pests and Plant Disease, Evin, Iran. 10 p. [In Persian].

Bolton, M. D., Kolmer, J. A., & Garvin, D. F. (2008). Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology*, *9*(5), 563-575. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x.

Brotman, Y., Kapuganti, J. G., & Viterbo, A. (2010). Trichoderma. *Current Biology*, *20*(9), R390. doi: 10.1016/j.cub.2010.02.042.

Bryson, R. J., & Brix, H. D. (2018). Challenges and prospects for fungicidal control of wheat diseases. In: Oliver, R. (Ed.). Integrated Disease Management of Wheat & Barley. Burleigh Dodds Science Publishing. pp. 239-254. doi: 10.1201/9780429201219.

Crampton, B. G., Hein, I., & Berger, D. K. (2009). Salicylic acid confers resistance to a biotrophic rust pathogen, *Puccinia substriata*, in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Molecular Plant Pathology*, *10*(2), 291-304. doi: 10.1111/j.1364-3703.2008.00532.x.

Dinu, M., Whittaker, A., Pagliai, G., Benedettelli, S., & Sofi, F. (2018). Ancient wheat species and human health: Biochemical and clinical implications. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *52*, 1-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.09.001.

Elavarthi, S., & Martin, B. (2010). Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Plant Stress Tolerance: Methods & Protocols*, *639*, 273-280. doi: 10.1007/978-1-60761-702-0_16.

Elsharkawy, M. M., Omara, R. I., Mostafa, Y. S., Alamri, S. A., Hashem, M., Alrumman, S. A., & Ahmad, A. A. (2022). Mechanism of wheat leaf rust control using chitosan nanoparticles and salicylic acid. *Journal of Fungi*, *8*(3), 1-18. doi: 10.3390/jof8030304.

Esfandiari, A. (1948). The rusts of grass in Iran. *Journal of Pests & Plant Disease*, *4*, 76-77. [In Persian]. doi: 10.22059/IJPPS.2021.314891.1006965.

Honglian, G., Yuguang, D., Xuefang, B., & Xiaoming, Z. (2003). Effects of active oxygen on suspended cotton cell culture by oligochitosan. *Zhongguo hai Yang yao wu= Chinese Journal of Marine Drugs*, *22*(1), 11-12. 35.

Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, *196*, 3-14. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.021.

Kolmer, J. (2013). Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests*, *4*(1), 70-84. doi: 10.3390/f4010070.

Koo, Y. M., Heo, A. Y., & Choi, H. W. (2020). Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *The Plant Pathology Journal*, *36*(1), 1-10. doi: 10.5423%2FPPJ.RW.12.2019.0295.

Liang, T. B., Wang, Z. L., Wang, R. J., Liu, L. L., & Shi, C. Y. (2007). Effects of potassium humate on ginger root growth and its active oxygen metabolism. *Ying Yong Sheng tai xue bao= The Journal of Applied Ecology*, *18*(4), 813-817.

Lim, S., Borza, T., Peters, R. D., Coffin, R. H., Al-Mughrabi, K. I., Pinto, D. M., & Wang-Pruski, G. (2013). Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. *Journal of Proteomics*, *93*, 207-223. doi: 10.1016/j.jprot.2013.03.010.

Lück, H. (1965). Peroxidase. In: Bergmeyer, H. U. (Ed.). Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press. pp. 895-897. doi: 10.1016/B978-0-12-395630-9.50159-6.

Manikandan, R., & Raguchander, T. (2014). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* retardation through induction of defensive response in tomato plants using a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1). *European Journal of Plant Pathology*, *140*, 469-480. doi: 10.1007/s10658-014-0481-y.

Mohammadi, M. A., Zhang, Z., Xi, Y., Han, H., Lan, F., Zhang, B., & Wang-Pruski, G. (2019). Effects of Potassium Phosphite on biochemical contents and enzymatic activities of Chinese potatoes inoculated by *Phytophthora infestans*. *Applied Ecology & Environmental Research*, *17*(2). 4499-4514. doi: 10.15666/aeer/1702_44994514.

Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 50369. doi: 10.3389/fpls.2013.00139.

O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, *46*, 293-304. doi: 10.1007/s13313-017-0481-4.

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., & Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, *154*(2), 536-541. doi: 10.1016/0003-2697(86)90026-6.

Peterson, R. F., Campbell, A. B., & Hannah, A. E. (1948). A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Canadian Journal of Research*, *26*(5), 496-500. doi: 10.1139/cjr48c-033.

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, *52*, 347-375. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340.

Pravisya, P., Jayaram, K. M., & Yusuf, A. (2019). Biotic priming with *Pseudomonas fluorescens* induce drought stress tolerance in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench (Okra). *Physiology & Molecular Biology of Plants*, *25*, 101-112. doi: 10.1007/s12298-018-0621-5.

Reuveni, R. (2017). Biochemical markers for disease resistance. In: Singh, U. S., & Singh, R. P. (Eds.). Molecular Methods in Plant Pathology. pp. 99-114. CRC Press. doi: 10.1201/9780203746523.

Serfling, A., Kopahnke, D., Habekuss, A., Novakazi, F., & Ordon, F. (2016). Wheat diseases: An overview. Burleigh Dodds Science Publishing. doi: 10.19103/AS.2016.0004.19.

Singh, J., Chhabra, B., Raza, A., Yang, S. H., & Sandhu, K. S. (2023). Important wheat diseases in the US and their management in the 21st century. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1010191. doi: 10.3389/fpls.2022.1010191.

Valadi, S., Soleimani, M. J., Khoda Karamian, G., & Ghiasvand, T. (2013). Effect of salicylic acid & chitosan on induction of resistance in chickpea against fusarial wilt & root rot. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *49*(2), 181-199. [In Persian].

Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, *47*, 177-206. doi: 10.1146/annurev.phyto.050908.135202.

Wani, A. B., Chadar, H., Wani, A. H., Singh, S., & Upadhyay, N. (2017). Salicylic acid to decrease plant stress. *Environmental Chemistry Letters*, *15*(1), 101-123. doi: 10.1007/s10311-016-0584-0.

Yadav, A. K., Kumari, A., & Anwar, A. (2019). Management of sheath blight of rice (*Oryza sativa*) under in-vitro condition with indigenous *Trichoderma* spp. *Journal of Pharmacognosy & Phytochemistry*, *8*(6), 1763-1771.

Yin, H., Bai, X., & Du, Y. (2008). The primary study of oligochitosan inducing resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* on *Brassica napus*. *Journal of Biotechnology*, 136, S600-S601. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.07.1217.

Zeilinger, S., & Omann, M. (2007). *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation & Systems Biology*, *1*, 227-234. doi: 10.4137/GRSB.S397.

Zheng, Y., Jia, A., Ning, T., Xu, J., Li, Z., & Jiang, G. (2008). Potassium nitrate application alleviates sodium chloride stress in winter wheat cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, *165*(14), 1455-1465. doi: 10.1016/j.jplph.2008.01.001.