

## نقش بتا آمینوبوتریک اسید (BABA) در القای مقاومت علیه سفیدک داخلی خیار و فعالیت آنزیم‌های وابسته به دفاع

سمیرا مشایخی<sup>۱</sup>، حمیدرضا علیزاده<sup>۲\*</sup>، امیررضا امیرمیجانی<sup>۲</sup> و خدیجه سالاری<sup>۳</sup>  
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و مربی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۸)

### چکیده

بیماری سفیدک داخلی خیار یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خیار در ایران و جهان است. در این پژوهش از ترکیب بتا آمینوبوتریک اسید (BABA) برای کاهش آسیب و زیان این بیماری به صورت غرقاب خاک و محلول‌پاشی برگ استفاده شد. برگ‌های گیاهان ۲۴ ساعت پس از تیمار با BABA جدا و پس از ماه‌زنی با بیمارگر درون جعبه‌های پلاستیکی با شرایط رطوبتی مطلوب بیمارگر قرار داده شدند. ارزیابی بیماری شش روز پس از تلقیح با بیمارگر انجام شد. نتایج نشان داد، کاربرد BABA به روش محلول‌پاشی برگ تأثیر معنی‌داری در کاهش بیماری نداشته و کاربرد خاک مصرف آن با ۶۲ درصد کاهش بیماری همراه بوده و به لحاظ آماری با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد. در مرحله دوم آزمایش تأثیر این ترکیب در شرایط گلخانه علیه بیماری و تغییر در فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز، پلی فنل اکسیداز (PPO)، پراکسیداز (POX) و فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL) در زمان‌های مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد، فعالیت آنزیم‌ها ۴۸ ساعت پس از ماه‌زنی با بیمارگر به سرعت افزایش داشته و پس از آن فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز، PAL و POX به تدریج کاهش یافت. در صورتی‌که فعالیت آنزیم PPO، پس از ۴۸ ساعت افزایش، با سرعت بیشتری کاهش پیدا کرد. این موضوع بیانگر ایجاد حالت آماده‌باش در گیاه در نتیجه کاربرد این ترکیب است.

واژه‌های کلیدی: فنیل آلانین آمونیا لایاز (PAL)، پراکسیداز (POX)، پلی‌فنل اکسیداز (PPO)، پرایمینگ، *Pseudoperonospora cubensis*.

## Role of $\beta$ -amino butyric acid (BABA) in the induction of resistance against cucumber downy mildew and activities of defense-related enzymes

Samira Mashayekhi<sup>1</sup>, Hamidreza Alizadeh<sup>2\*</sup>, Amirreza Amirmijani<sup>2</sup> and Khadijeh Salari<sup>3</sup>  
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Assistant Professor and Instructor, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Iran  
(Received: Nov. 22, 2017 - Accepted: Feb. 27, 2018)

### ABSTRACT

Cucumber downy mildew caused by *Pseudoperonospora cubensis* is one of the most important diseases of cucumber in Iran. In this investigation the role of  $\beta$ -Aminobutyric acid (BABA) in reducing this disease was studied via spraying of leaves and soil drench. The plants were treated with BABA and after 24 hours leaves were detached and inoculated with the pathogen and kept in a plastic box with favorable conditions for the disease agent. The disease was evaluated six days after inoculation with pathogen by scoring the leaves between 0-9 and the disease index calculated. Result showed that spraying the leaves by BABA had no effect on the disease reduction but soil application of this compound statistically reduced the disease ( $p \leq 0.05$ ). The second phase of the experiment was done for evaluating the effect of BABA on the activity of enzymes such as  $\beta$ -1,4-Glucanase, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase. Enzymes activity was assayed at 0, 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation with the pathogen. Results showed an increase in enzyme activity at 48-hours post-inoculation with the pathogen and then  $\beta$ -1,4-Glucanase, PAL, and POX enzymes activities decreased slowly, while PPO enzymes activity decreased rapidly.

**Keywords:** Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Peroxidase (POX), Polyphenol oxidase (PPO), Priming, *Pseudoperonospora cubensis*.

\* Corresponding author E-mail: hamidalizadeh@ujiroft.ac.ir

علیه دامنه گسترده‌ای از بیمارگرهای خاکزی و برگ‌گی مؤثر است (Justyna *et al.*, 2013). مقاومت به سفیدک داخلی کاهو توسط BABA در نتیجه تجمع PR پروتئین‌ها، رسوب کالوز و افزایش پراکسید هیدروژن گزارش شده است (Cohen *et al.*, 2009). در این تحقیق از BABA به‌عنوان القاکننده مقاومت علیه سفیدک داخلی خیار استفاده شد، پس از آن فعالیت برخی آنزیم‌های دفاعی به‌منظور تعیین نقش آن‌ها در مقاومت گیاه به بیمارگر بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

#### ایجاد خزانه بیماری

برای حفظ دائمی آلودگی و تأمین مایه تلقیح کافی برای همه آزمایش‌ها، خزانه بیماری ایجاد شد. بذرهاى خیار رقم سوپردامینوس جوانه‌دار شده در گلدان‌های پر شده با خاک مزرعه و خاک‌برگ به نسبت ۱:۶ کشت و در گلخانه با دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد رشد داده شدند. پس از مایه‌زنی بوته‌ها با سوسپانسیون (درویه) اسپورانژیوم بیمارگر شرایط رطوبتی بالای ۹۰ درصد برای ایجاد بیماری فراهم شد. دو هفته پس از مایه‌زنی با بیمارگر، نخستین نشانه‌های آلودگی روی بوته‌های خیار ظاهر شد.

#### ترکیب شیمیایی

بتا آمینوبوتریک اسید ( 3-Aminobutanoic acid ) 97%، ساخت شرکت سیگما، به‌میزان ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ( Jeun *et al.*, 2004; Hamiduzzaman *et al.*, 2005) در آب مقطر سترون تهیه شد.

#### تهیه سوسپانسیون اسپورانژ بیمارگر

برای تهیه مایه تلقیح بیمارگر، برگ‌های آلوده با نشانه‌های رنگ‌پریدگی از خزانه بیماری گردآوری و به مدت یک شبانه‌روز در رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد برای تولید اسپورانژیوم قرار داده شدند. اسپورانژیوم‌ها از سطح زیرین برگ به کمک یک قلم‌مو در آب سترون جدا شدند (Kim Khiook *et al.*, 2013). به‌منظور مایه‌زنی گیاهان، با استفاده از لام هموسیتمتر، سوسپانسیون اسپورانژیوم

### مقدمه

سفیدک داخلی خیار ناشی از *Pseudoperonospora cubensis* (B.&C) Rostovzev یکی از بیماری‌های زیانبار گیاهان خانواده کدوئیان است، که هر ساله آسیب و زیان زیادی به این محصول در سراسر جهان وارد و منجر به کاهش محصول در گلخانه و جالیزار می‌شود (Ahmad *et al.*, 2000). رایج‌ترین روش کنترل (مهار) این بیمارگر بیوتروف (زیواپرور) کاربرد قارچ‌کش‌های سیستمیک (فراگیر) به‌تنهایی و یا در ترکیب با ترکیب‌های محافظتی است. با توجه به گزارش‌ها در زمینه مقاومت بیمارگر به قارچ‌کش‌های سیستمیک (Bagi *et al.*, 2014) و خطرهای چالش‌های مختلف زیست‌محیطی، در سال‌های اخیر ترکیب‌های القاکننده مقاومت گیاه به میزان زیادی بررسی شده است (Gozzo, 2003). القاکننده‌های با منشأ شیمیایی شامل: ۲، ۶-دی کلرو ایزو نیکوتینیک اسید (INA)، بتا آمینو بوتریک اسید (BABA)، بنزوتیادپازول (BTH)، سالیسیلیک اسید و ترکیب‌هایی با منشأ موجودهای زنده مانند کیتوزان، لامینارین، ریبوفلاوین، تیامین مقاومت را در گیاهان القا می‌کنند ( Benhamou *et al.*, 1992; Cohen, 1994; Godard *et al.*, 1999; Llorens *et al.*, 2017). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده است، بتا آمینوبوتریک اسید باعث القای مقاومت در گیاهان همراه با افزایش بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و تشکیل کالوس (پینه)، لیگنین، تولید و تجمع فیتوآلکسین‌ها در بافت‌های گیاه می‌شود (Cohen, 1994; Hwang *et al.*, 1997; Cohen, 2001). به‌عنوان القاکننده شیمیایی برای نخستین بار توسط پاپاوویاز (Papavizas, 1964)، علیه پوسیدگی ریشه نخود ناشی از *Aphanomyces eutiches* گزارش شد. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد، BABA قادر به القای مقاومت در گیاهان مختلف علیه امیست‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نماتدها است ( Alizadeh & Salari, 2014; Cohen *et al.*, 1999; Jakab *et al.*, 2001; Oka *et al.*, 1999). این ترکیب در دو جهت متفاوت<sup>۱</sup> در گیاه حرکت می‌کند و به‌طور سیستمیک

انجام شد. نمونه برداری از برگ‌های گیاه در مقاطع زمانی ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به منظور بررسی فعالیت آنزیمی انجام شد. نمونه‌ها داخل فویل آلومینیوم پیچیده و پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا انجام مرحله‌های بعدی آزمایش نگهداری شدند.

#### ارزیابی بیماری

ارزیابی بیماری شش روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر بر اساس مقیاس یک تا نه و با استفاده از نمره‌دهی نشانه‌های روی برگ‌ها، ۰=برگ سالم، ۱= بروز لکه‌های نکروزه (بافت مرده)، ۲= لکه‌های کلروزه (سبزروی) بیشتر، بدون اسپورزایی، ۳= اسپورزایی خیلی کم و پراکنده، تعداد محدودی اسپورانژیوفور در محل‌های نکروزه، ۵= اسپورزایی پراکنده، ۷= اسپورزایی زیاد به همراه لکه‌های کلروز و نکروز، ۹= نشانه‌های شدید از اسپورزایی و نکروز و چروکیدگی برگ (Silué et al., 1996)، انجام گرفت. سپس شاخص بیماری با رابطه زیر برای هر تکرار محاسبه شد (Godard et al., 1999).

$$\times 100 = \frac{\sum (\text{تعداد گیاه رتبه} \times \text{رتبه})}{\text{تعداد کل گیاه}} \times \text{شاخص بیماری}$$

#### استخراج آنزیم‌ها

به منظور تهیه عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی، ۰/۵ گرم بافت برگ‌های سیستمیک (تیمار نشده) در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع به خوبی ساییده و پس از آن ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج هر آنزیم به عصاره به دست آمده اضافه شد. عصاره به دست آمده بی‌درنگ به میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. محلول رویی به میکروتیوپ مشابه منتقل و به منظور استخراج بهتر آنزیم، میکروتیوپ‌های حاوی نمونه را به مدت ۲۴ ساعت در حالت سکون و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Nandeeshkumar et al., 2008).

#### سنجش فعالیت آنزیم گلوکاناز

پس از همگن کردن ۰/۵ گرم از برگ منجمد شده مربوط

با غلظت ۵×۱۰<sup>۴</sup> اسپورانژیوم در هر میلی‌لیتر، تهیه شد (Hamiduzzaman et al., 2005).

#### اجرای آزمایش روی برگ‌های جدا شده

در این آزمایش، کاربرد BABA به دو روش محلول‌پاشی برگ و غرقاب خاک (soil drench) انجام شد. در روش محلول‌پاشی برگ، نخستین برگ حقیقی با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از ترکیب BABA تیمار شد و دیگر قسمت‌های گیاه پوشانده شد که محلول به آن‌ها نرسد. در روش غرقاب کردن خاک، چهار حفره اطراف گیاه ایجاد و ترکیب شیمیایی در این حفره‌ها به کار برده شد (۳۰۰ میلی‌لیتر به ازای ۱۰۰۰ گرم خاک) (Perazzoli et al., 2008)، در هر دو روش، برگ‌های جدا شده با سوسپانسیون اسپورانژیوم بیمارگر ۵×۱۰<sup>۴</sup> اسپورانژیوم در هر میلی‌لیتر (Hamiduzzaman et al., 2005) محلول‌پاشی و به مدت شش روز درون جعبه‌های مخصوص قرار داده شدند. کف جعبه‌ها به ترتیب با یک لایه پنبه سترون خیس، یک لایه کاغذ واتمن مرطوب سترون پوشانده و برگ‌هایی که با سوسپانسیون اسپورانژیوم بیمارگر محلول‌پاشی شدند روی بستر یاد شده (به طوری که سطح رویی برگ به سوی پایین باشد) قرار گرفتند. به منظور جلوگیری از کاهش رطوبت درون جعبه‌ها، در آن‌ها با پارافیلیم پوشیده شد. جعبه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی مطلق قرار داده شدند، سپس به شرایط مناسب ایجاد بیماری (۲۰ درجه سلسیوس روز و ۱۶ درجه سلسیوس شب)، منتقل شدند.

#### انجام آزمایش در شرایط گلخانه

بذرهای جوانه‌دار خیار در گلدان‌های پر شده با خاک مزرعه، خاک‌برگ و پیت به ترتیب به نسبت ۲:۱:۱ (دو بار سترون شده به فاصله ۲۴ ساعت) کشت شدند و در شرایط گلخانه با دمای ۲۴ درجه سلسیوس، دوره نوری ۱۴ ساعت و رطوبت نسبی ۷۰ درصد رشد داده شدند. گلدان‌ها هر هفته سه بار آبیاری شده و پس از اینکه گیاهان به مرحله چهار برگی رسیدند BABA به روش غرقاب خاک با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۳۰۰ میلی‌لیتر به ازای ۱۰۰۰ گرم خاک) به کار برده شد و پس از ۲۴ ساعت مایه‌زنی با بیمارگر

(pH 7) اضافه شد. مخلوط واکنش شامل ۲۸۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار (pH 7)، ۱۰۰ میکرولیتر کتکول ۰/۳ میلی‌مولار محلول در آب دو بار تقطیر بود. در پایان به مخلوط واکنش ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی اضافه شد. تغییرات جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج ۴۲۰ نانومتر و در مدت‌زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاپاز

۰/۵ گرم از برگ منجمد شده در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع به‌خوبی ساییده شد و با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر ۲۵ میلی‌مولار Tris-HCL (pH 8.8) همگن شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه، ۹۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۵۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCL به مدت دو ساعت در حمام آب گرم ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. واکنش با اضافه کردن ۶۰ میکرولیتر HCL ۵ نرمال متوقف شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف سینامیک اسید رسم شد (Beaudoin-Eagan&Thorpe, 1985).

#### تغییرات فعالیت آنزیم‌های دفاعی

روند تغییر در فعالیت آنزیم‌های دفاعی گلوکاناز، پراکسیداز (POX)، پلی فنل اکسیداز (PPO) و فنیل آلانین آمونیاپاز (PAL) در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر برای بررسی تغییر در سیستم ایمنی گیاه توسط BABA ارزیابی شد.

#### سنجش میزان پروتئین کل

پروتئین کل موجود در عصاره گیاه با روش Bradford (1976)، انجام گرفت. بدین‌صورت که ۱۰ میلی‌گرم پودر کوماسی بریلیانت بلو در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد. آنگاه روی شیکر (دستگاه لرزا) ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید فسفریک ۸۵ درصد قطره‌قطره به محلول بالا اضافه شد و با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تعیین میزان

به هر تیمار در ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH 5.2)، بررسی فعالیت آنزیم گلوکاناز به روش Yedidia et al. (2000)، با تغییرهایی صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ درصد کربوکسی متیل سلولز که در بافر استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH 5) تهیه شده بود و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاه بود. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شد و پس از آن با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) و قرار دادن مخلوط واکنش در آب جوش به مدت پنج دقیقه، واکنش متوقف شد. سپس حجم مخلوط واکنش با آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) جذب نوری آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف گلوکز رسم شد (Safdarpour et al., 2013).

#### سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Chance & Maehly (1955) اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم بافت برگ در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع به‌خوبی ساییده، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7) به آن اضافه شد. مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7) ۷۵۰، ۹۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار محلول در فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، ۷۵۰ میکرولیتر گویئکول ۱۰ میلی‌مولار محلول در آب دو بار تقطیر، ۷۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل (سترون) شده، به‌اضافه ۲ میکرولیتر از عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (طیف‌سنج نوری)، در طول موج ۴۷۰ نانومتر و در مدت‌زمان واکنش ۱۸۰ ثانیه اندازه‌گیری شد.

#### سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز به روش Chen et al. (2000) اندازه‌گیری شد. ۱ گرم بافت برگ در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع به‌خوبی ساییده، سپس به آن ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار

به کار بردند و به خوبی القای مقاومت در آرابیدوبسیس علیه *Botrytis cinerea* در گوجه‌فرنگی علیه *Phytophthora infestans* و *B. cinerea* در تنباکو علیه *Peronospora tabacina* و TMV و در انگور علیه *Plasmopara viticola* را گزارش کردند (Luna et al., 2015; Oka et al., 1999; Siegrist et al., 2000; Cohen et al., 1999; Wilkinson et al., 2018). از طرفی القای مقاومت سیستمیک توسط BABA در نتیجهٔ محلول‌پاشی اندام‌های هوایی در گیاهان و بیمارگرهای دیگر گزارش شده است، محلول‌پاشی سیب‌زمینی با BABA در کنترل *Phytophthora Infestans* مؤثر بوده است (Bengtsson et al., 2014). احتمال دارد مؤثر بودن نوع تیمار بستگی به غلظت BABA و نوع میزبان و بیمارگر داشته باشد.

#### ارزیابی بیماری در شرایط گلخانه

آزمون گلخانه‌ای به منظور تعیین تأثیر BABA و بررسی آنزیم‌های القاشده علیه *P. cubensis* انجام شد. تأثیر این ترکیب در گلخانه در میزان بازدارندگی از سفیدک داخلی خیار نشان داد، شاخص بیماری در تیمار ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BABA و شاهد به ترتیب ۴۸ و ۶۹ درصد بوده و با شاهد در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارد (شکل ۲). با توجه به اینکه در این پژوهش ترکیب BABA از طریق ریشه‌ها جذب شده و تلقیح بیمارگر در برگ‌ها صورت گرفته است، نمی‌توان کاهش بیماری را به اثر مستقیم این ترکیب بر بیمارگر مرتبط دانست. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده تأثیر این ترکیب بر فیزیولوژی گیاه از طریق القای مقاومت است. نتایج این پژوهش با نتایج گزارش شده توسط Jeun et al. (2004) در زمینهٔ کاهش شدت بیماری در گیاهان خیار آلوده به بیماری آنتراکنوز همخوانی دارد. این محافظت با کاربرد ۱ و ۱۰ میلی‌مولار BABA گزارش شده بود. همچنین در نتایج بررسی دیگری گزارش شده است، کاربرد ۲ و ۴ میلی‌مولار BABA در خاک، ۴۸ ساعت پیش از مایه‌زنی با *P. viticola* باعث کاهش شدت بیماری سفیدک داخلی انگور در گیاهان مرد بررسی شده است (Hamiduzzaman et al., 2005).

پروتئین کل عصارهٔ مورد آزمایش، مقدار ۵ میکرولیتر از عصارهٔ هر نمونه با ۳ میلی‌لیتر محلول برادفورد کاملاً مخلوط شد و میزان جذب نور در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

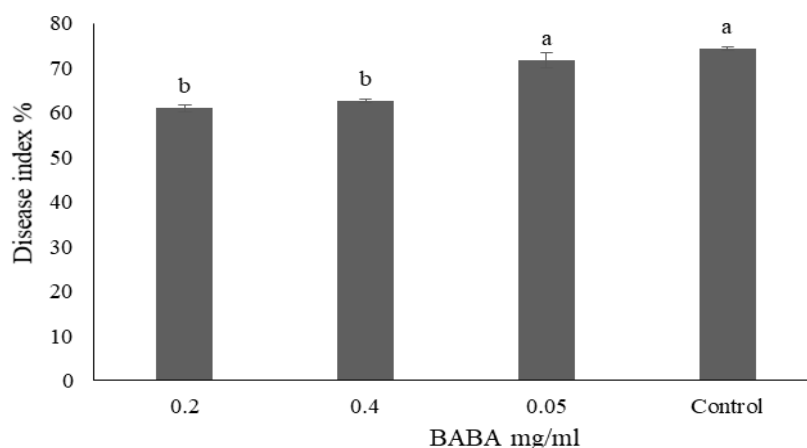
#### تجزیهٔ داده‌ها

این بررسی به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در چهار تکرار جداگانه انجام شد. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 تجزیه و تحلیل و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel (2013) ترسیم شدند. مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

#### نتایج و بحث

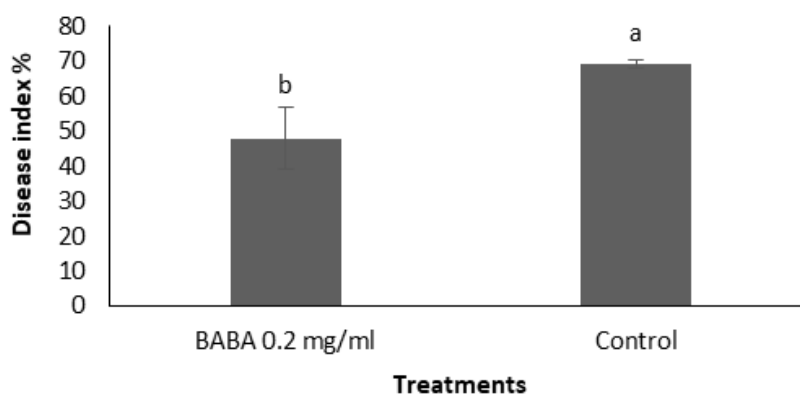
##### آزمایش با برگ‌های جداشده

این آزمایش به منظور تعیین غلظت مؤثر BABA در القای مقاومت علیه *P. cubensis* انجام شد. در کاربرد BABA به صورت غرقاب خاک شاخص بیماری برای تیمارهای ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BABA و شاهد به ترتیب ۷۱/۶۶، ۶۱/۳۳، ۶۲/۶۶ و ۷۴ درصد محاسبه شد و تیمارهای ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری را با شاهد داشتند (شکل ۱). کاربرد BABA به روش محلول‌پاشی برگ تأثیر معنی‌داری در کاهش بیماری نشان نداد. سیلو و همکاران القای مقاومت در گیاه کلم علیه سفیدک داخلی را در نتیجهٔ کاربرد BABA در خاک گزارش کردند، درحالی‌که کاربرد برگی آن مؤثر در القای مقاومت سیستمیک نبود و مؤثر بودن تیمار خاک را به دلیل قابلیت انتقال رو به بالای این ترکیب در آوندهای چوبی گزارش کردند و به نظر می‌رسد حرکت جانبی این ترکیب در اندام‌های هوایی گیاه کم باشد (Silue et al., 2002). القای مقاومت با BABA در آرابیدوبسیس (علف‌تال) همراه با واکنش گذرای شبیه کمبود آهن گزارش شده و در شرایط آزمایشگاهی دیده شده که BABA آهن را کلاته می‌کند و با این سازوکار گیاه را به حالت آماده‌باش در می‌آورد (Koen et al., 2014). این ویژگی می‌تواند مؤثر بودن تیمار خاکی این ترکیب را توجیه کند. در بیشتر پژوهش‌ها BABA را در خاک



شکل ۱. تأثیر کاربرد غلظت‌های مختلف BABA (mg/ml) در خاک بر شاخص بیماری ناشی از *P. cubensis* برگ‌های گیاهان تیمار شده پس از ۲۴ ساعت از گیاه جدا و پس از قرار دادن در جعبه‌های پلاستیکی با بیمارگر تلقیح شدند. داده‌های به‌دست‌آمده به روش تجزیه واریانس تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد. ستون‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند ( $P \leq 0.05$ ).

Figure 1. Effect of soil drenching with BABA on disease index of *P. cubensis*. The leaves were detached 24 h after application of BABA and inoculated with the pathogen in plastic boxes. The data were analyzed using analysis of variance and the means were compared by the Tukey's test. The columns with same letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).



شکل ۲. تأثیر BABA (mg/ml) بر شاخص بیماری ناشی از *P. cubensis* در گیاهان خیار در شرایط گلخانه. گیاهان به روش غرقاب خاک تیمار و پس از ۲۴ ساعت با بیمارگر مایه‌زنی شدند. ارزیابی بیماری پس از شش روز انجام و داده‌های به‌دست‌آمده به روش تجزیه واریانس آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد. ستون‌های دارای دست‌کم یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند ( $P \leq 0.05$ ).

Figure 2. Effect of BABA soil drench on disease index of *P. cubensis* in greenhouse condition. The plants were treatment with BABA and after 24 h inoculation with the pathogen. The disease was evaluated after six days. The data were analyzed using analysis of variance and the means were compared by the Tukey's test. Means with same letters are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

۰/۰۳۲، ۰/۰۳۳ و ۰/۰۳۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد. در نتیجه این تیمار افزایش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم پس از ۴۸ ساعت دیده شد و در زمان‌های بعدی سطح آن ثابت ماند. در گیاهانی که

#### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم گلوکاناز

در گیاهان تیمار شده با بیمارگر، میزان تغییرات آنزیم گلوکاناز در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر به ترتیب ۰/۰۱۶، ۰/۰۲۳،

#### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

میزان تغییرات آنزیم POX در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر در گیاهان خیار به ترتیب ۲/۲۴، ۲/۹۹، ۳/۸۵، ۲/۲۹ و ۱/۹۹ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود. در گیاهان تیمار شده با BABA فعالیت آنزیم POX را در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به ترتیب برابر با ۲/۷۷، ۴/۱۱، ۶/۱۳، ۴/۶۵ و ۵/۶۸ واحد بر میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شد. این نتایج نشان می‌دهد، فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با BABA افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان تلقیح‌شده با بیمارگر به‌تنهایی دارد و بیشترین افزایش در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر مشاهده شد و پس از آن در زمان‌های بعدی کاهش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل D-۳). گیاهان همواره از طریق دامنه گسترده‌ای از ترکیب‌های دفاعی در برابر عامل‌های بیماری‌زای گیاهی از خود محافظت می‌کنند. آنزیم پراکسیداز به‌عنوان مارکری (نشانگری) برای القای مقاومت در گیاه از طریق افزایش استحکام دیواره سلولی گزارش شده است (Kuć, 2001). این آنزیم با دخالت در مرحله نهایی تولید لیگنین باعث افزایش مقاومت به بیمارگر می‌شود (Lagrimini et al., 1987). همچنین آنزیم پراکسیداز، از جمله آنزیم‌های اکسایشی (اکسیداتیو) با ماهیت پروتئینی است که برای استحکام ساختار سلولی مورد نیاز است. پژوهشگران نقش این آنزیم را در مقاومت علیه بیمارگرها گزارش کرده‌اند (Marcucci et al., 2010; Cohen et al., 2009; Altamiranda et al., 2008; Cohen, 1994).

#### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

میزان تغییرات آنزیم PPO در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر در گیاهان تیمار شده با بیمارگر به ترتیب ۰/۱۷، ۰/۲۳، ۰/۳۲، ۰/۳۰ و ۰/۲۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود. گیاهان تیمار شده با BABA تغییرات آنزیم PPO را در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به ترتیب معادل ۰/۲۰، ۰/۲۸، ۰/۵۷، ۰/۳۳

۲۴ ساعت پیش از تیمار با بیمارگر با BABA تیمار شده بودند فعالیت آنزیم گلوکاناز را در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر به ترتیب برابر با ۰/۲۳، ۰/۳۰، ۰/۵۶، ۰/۴۵ و ۰/۵۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین نشان داده شد. این نتایج نشان داد، فعالیت آنزیم گلوکاناز در نتیجه تیمار BABA در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر نسبت به تیمار شاهد افزایش چشمگیری داشته و بیانگر القای فعالیت این آنزیم در نتیجه تیمار با BABA است (شکل C-۳). این نتایج بیانگر القای مقاومت سیستمیک در گیاه در نتیجه کاربرد این ترکیب است. این مقاومت برای گیاه هزینه اضافی ایجاد نمی‌کند زیرا که حالت آماده‌باش (Priming) در گیاه برای این آنزیم القا شده است نه افزایش بیان این آنزیم پیش از حضور بیمارگر. ایجاد حالت آماده‌باش یک ویژگی بسیار مثبت برای یک القاکننده مقاومت است (Ton & Mauch-Mani, 2004; Conrath et al., 2002). نقش گلوکاناز (یکی از اعضای خانواده PR2) در مقاومت به بیماری‌های مختلف ثابت شده است. این آنزیم از طریق هضم گلیکوزید موجود در گلوکان که ساختمان اصلی دیواره یاخته‌ای (سلولی) او میسرها را تشکیل می‌دهند، سبب تخریب این پلی ساکارید و در نهایت از بین رفتن بیمارگر می‌شود (Simmons et al., 1994). همچنین PR2 پروتئینی است که در تشکیل پایلا در محل نفوذ بیمارگر نقش دارد (Hu & Rijkenberg, 1998). بنابر نتایج بررسی‌های Cohen et al. (2009)، مقاومت به سفیدک داخلی کاهو در نتیجه تیمار با BABA، همراه با تجمع  $H_2O_2$ ، رسوب کالوز و تجمع PR پروتئین‌ها گزارش شد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های بتا-۳-گلوکاناز و کیتینازها در گیاهان فلفل تیمار شده با BABA پس از مایه‌زنی با *Phytophthora capsici* و القای مقاومت وابسته به سالیسیلیک اسید و بیان PR پروتئین‌ها گزارش شده است (Hwang et al., 1997). Lavanya et al. (2012) نیز در نتایج بررسی‌های خود افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز و پراکسیداز را در نتیجه کاربرد BABA و سپس مایه‌زنی با *Sclerotinia sclerotiorum* گزارش کردند.

داشتند. پس از آن کاهش در فعالیت آنزیم مشاهده شد. افزایش آنزیم در تیمار با BABA به طور معنی داری با تیمار گیاهان با بیمارگر به تنهایی افزایش در فعالیت این آنزیم دیده می شود (شکل A-۳). افزایش آنزیم PAL در گیاه در نتیجه ترکیب های القاکننده مقاومت از عامل های احتمالی موفقیت این ترکیب ها است که طی یکسری واکنش های پیچیده در گیاه صورت می گیرد. این آنزیم نخستین آنزیم در مسیر فنیل پروپانویید است. نتایج بررسی ها نشان داده است، تیمار با ترکیب های القاکننده مقاومت به طور فعال با افزایش PAL ارتباط دارد (Bhuiyan *et al.*, 2009). به نظر می رسد این ترکیب ها با ساخت سدهای فیزیکی در تحریک سازوکارهای دفاعی در برابر بیماری ها مؤثر هستند (Lavanya *et al.*, 2012; Barilli *et al.*, 2012; Slaughter *et al.*, 2008). همچنین آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز نقش اصلی را در ساخت (سنتر) اسیدهای آمینه آروماتیک (معطر) و متابولیت های ثانویه دارد و همچنین نقش کلیدی در تنظیم محصولات حاصل از مسیر فنیل پروپانویید ایفا می کند. مسیر فنیل پروپانوییدی، مسیر اولیه تولید بسیاری از ترکیب های فنلی است. در واقع امکان تبدیل فنیل آلانین به ترانس اسید سینامیک را فراهم ساخته و سبب ادامه چرخه و تولید مواد فنلی می شود. ترانس اسید سینامیک پیش ماده اصلی تولید فلاونوئیدها و لیگنین هاست و بنابراین افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانوییدی می شود (Chen *et al.*, 2006).

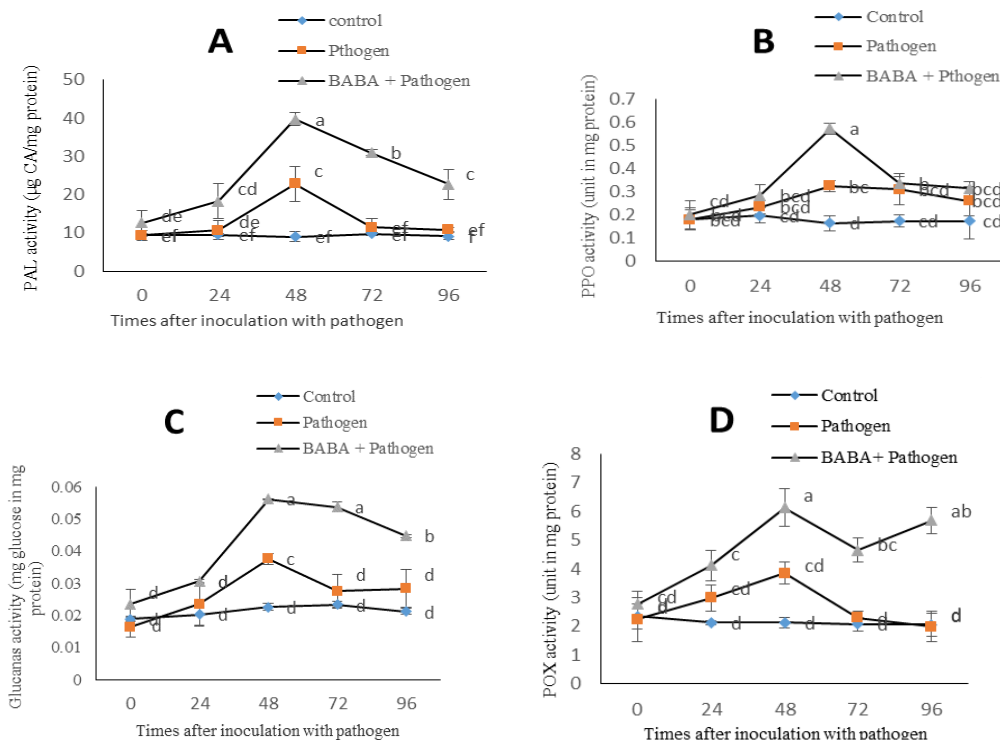
در این بررسی فعالیت آنزیم های گلوکاناز، PAL، POX و PPO در زمان ۰ در گیاهان تیمار شده با BABA و شاهد اختلاف معنی داری نداشت. نتایج بیانگر این است که، پیش از تلقیح با *P. cubensis* تغییر معنی داری در افزایش این آنزیم ها ایجاد نمی شود، اما بیان این آنزیم ها را به حالت آماده باش در آورده که ۴۸ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر به سرعت افزایش نشان می دهند. این نتایج با یافته های دیگر پژوهشگران مبنی بر ایجاد آماده باش دفاعی توسط BABA همخوانی دارد (Ton *et al.*, 2005; Altamiranda *et al.*, 2008; Marcucci *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2011).

و ۰/۳۱ واحد بر میلی گرم پروتئین نشان دادند. بنابر نتایج به دست آمده، تغییرات آنزیمی در نتیجه تیمار BABA در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر با تیمار کاربرد بیمارگر به تنهایی در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار نشان داد، پس از آن میزان فعالیت این آنزیم به سرعت کاهش پیدا کرد (شکل B-۳). به نظر می رسد تنها یک پیک (نقطه اوج) افزایشی در فعالیت این آنزیم در نتیجه کاربرد BABA ایجاد و پس از آن فعالیت آن کاهش می یابد این پیک افزایشی در گیاهانی که تنها با بیمارگر تلقیح شده بودند مشاهده نشد که این بیانگر القای این آنزیم در نتیجه کاربرد این ترکیب است. افزایش آنزیم PPO در گیاه از عامل های احتمالی موفقیت ترکیب های القاکننده مقاومت است که در یکسری واکنش های پیچیده در گیاه صورت می گیرد. به نظر می رسد این ترکیب ها با ماهیت فنلی و نقشی که در فرآیند اکسایش (اکسیداسیون) فنل ها به کینون و تشکیل لیگنین در سلول های گیاهی بر عهده دارند، قادر به جلوگیری از نفوذ بیمارگرها به بافت های گیاه هستند. نتایج تحقیقات نشان داده است، این آنزیم ها در فعالیت دفاعی و واکنش یاد شده حساسیت در برابر ویروس ها، باکتری ها و قارچ ها دخالت دارند (Mayer, 2006). نتایج این پژوهش با یافته های پژوهشگران دیگر مبنی بر القای ترکیب های فنلی علیه بیمارگرهای بیوتروف مختلف همخوانی دارد (Lavanya *et al.*, 2012; Barilli *et al.*, 2012; Slaughter *et al.*, 2008).

#### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

میزان تغییرات آنزیم PAL در زمان های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر ۹/۳۳، ۱۰/۷۳، ۲۲/۸۴، ۱۱/۵۲ و ۱۰/۸۷ واحد بر میلی گرم پروتئین بود. در گیاهان تیمار شده با BABA پس از تلقیح با بیمارگر تغییرات آنزیم PAL را در زمان های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر به ترتیب برابر با ۱۲/۶۶، ۱۸/۳۳، ۳۸، ۳۱ و ۲۲/۶۶ واحد بر میلی گرم پروتئین نشان دادند (شکل A-۳). گیاهان تیمار شده با BABA در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر بیشترین افزایش فعالیت آنزیم را





شکل ۳. میزان فعالیت آنزیم فنیل الانین آمونیا لیاز (A)، پلی فنل کسیداز (B)، گلوکاناز (C) و پراکسیداز (D) در گیاهان خیار در فاصله‌های زمانی مختلف پس از تلقیح با *P. cubensis*، دادها با روش تجزیه واریانس تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد. تیمارهای دارای حرف‌های مشترک اختلاف معنی‌داری ندارند ( $P \leq 0.05$ ).

Figure 3. Activity of PAL (A), PPO (B), Glucanase (C) and POX (D) in cucumber plants at different times after inoculation with *P. cubensis*. The data were analyzed using analysis of variance and the means were compared by the Tukey's test. Means with same letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

خاک مؤثرتر از کاربرد برگی آن است تیمار گیاهان با BABA منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی نشد ولی پس از تیمار با بیمارگر فعالیت این آنزیم‌ها بشدت افزایش داشت که نشان‌دهنده ایجاد حالت آماده‌باش (Priming) در نتیجه کاربرد این ترکیب در گیاه است. این پژوهش پتانسیل (قابلیت) این ترکیب را در کاهش بیماری سفیدک داخلی خیار اثبات می‌کند.

### نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش بررسی بیماری روی برگ‌های جداشده خیار را روشی مناسب برای بررسی این انگل اجباری معرفی می‌کند. در این پژوهش برای نخستین بار نقش BABA در القای مقاومت علیه سفیدک داخلی خیار بررسی و نتایج نشان داد، این ترکیب در القای مقاومت علیه این بیمارگر مؤثر است و کاربرد این ترکیب در

### REFERENCES

- Ahamad, S., Narain, U., Prajapati, R. & LAL, C. (2000). Management of downy mildew of Cucumber. *Annals of Plant Protection Sciences*, 8(2), 254-255.
- Alizadeh, H. & Salari, Kh. (2015). Induced resistance by  $\beta$ -amino butyric acid (BABA) against fusarium stem and root rot of cucumber. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 45(2), 299-307
- Altamiranda, E., Andrendreu, A., Daleoo, G. & Olivieri, F. (2008). Effect of  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. *Australasian Plant Pathology*, 37(4), 421-427.
- Bagi, F. F., Budakov, D. B., Bursic, V. P., Stojšin, V. B., Lazic, S. D. & Vukovic, S. M. (2014). Efficacy of azoxystrobin for the control of cucumber downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) and fungicide residue analysis. *Crop Protection*, 61(0), 74-78.
- Barilli, E., Rubiales, D. & Castillego, M. Á. (2012). Comparative proteomic analysis of BTH and BABA-induced resistance in pea (*Pisum sativum*) toward infection with Pea rust (*Uromyces pisi*). *Journal of Proteomics*, 75(17), 5189-5205.

6. Bengtsson, T., Weighill, D., Proux-Wéra, E., Levander, F., Resjö, S., Burra, D. D., Moushib, L. I., Hedley, P. E., Liljeroth, E., Jacobson, D., Alexandersson, E. & Andreasson, E. (2014). Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics*, 15(1), 315.
7. Beudoin-Eagan, L. D. & Thorpe, T. A. (1985). Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, 78(3), 438-441.
8. Benhamou, N. & Theriaul, G. (1992). Treatment with chitosan enhances resistance of Tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41(1), 33-52.
9. Bhiyan, N. H., Selvarag, G., Wei, Y. & King J. (2009). Gene expression profiling and silencing reveal that monoglignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 509-521.
10. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
11. Chahance, B. & Maehly, A. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
12. Chen, C., Belanger, R. R., Benhamou, N. & Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(1), 13-23.
13. Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M., Wan, S. B. & Huang, W. D. (2006). Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. *Postharvest Biology and Technology*, 40(1), 64-72.
14. Cohen, Y. (1994). 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 44(4), 273-288.
15. Cohen, Y. (2001). The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica*, 29(5), 375-378.
16. Cohen, Y., Niderman T., Mosinger, E. & Fluhr, R. (1994). beta-Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, 104(1), 59-66.
17. Cohen, Y. Reuveni, M. & Baider, A. (1999). Local and systemic activity of BABA (DL-3-aminobutyric Acid) against *Plasmopara viticola* in Grapevines. *European Journal of Plant Pathology*, 105(4), 351-361.
18. Cohen, Y. Rubin, A. & Vaknin, M. (2011). Post infection application of DL-3-amino-butyric acid (BABA) induces multiple forms of resistance against *Bremia lactucae* in lettuce. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1), 13-27.
19. Cohen, Y., Rubin, A. E. & Kilfin, G. (2009). Mechanisms of induced resistance in lettuce against *Bremia lactucae* by DL-β-amino-butyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology*, 126(4), 553-573.
20. Conrath, U., Pieterse, C. M. J. & Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7(5), 210-216
21. Godard, J. F., Ziadi, S. L., Monot, C., Corre, D. L. & Silué D. (1999). Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. *Crop Protection*, 18(6), 397-405.
22. Gozzo, F. (2003). Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4487-4503.
23. Hamiduzzaman, M. M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J. M. & Mauch-Mani, B. (2005). β-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(8), 819-829.
24. Hu, G. & Rijkenberg, F. H. (1998). Subcellular localization of β-1, 3-glucanase in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*-infected wheat leaves. *Planta*, 204(3), 324-334.
25. Hwang, B., Ksunwoo, J. Y., Kim, Y. J. & Kim, B. S. (1997). Accumulation of β-1, 3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL-β-amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51(5), 305-322.
26. Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Metraux, J. P. & Mauch-Mani, B. (2001). β-Aminobutyric Acid-induced Resistance in Plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 29-37.
27. Jeun, Y. C., Lee, Y. J. & Bae, Y. S. (2004). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in cucumber plants against anthracnose disease caused by *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of Plant Pathology* 20, 172-176.
28. Justyna, P. G. & Ewa, K. (2013). Induction of resistance against pathogens by β-aminobutyric acid. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (6), 1735-48.

29. Kim Khoook, I. L., Schneider, C., Heloir, M. C., Bis, B., Daire X., Adrian, M. & Trovelot, S. (2013). Image analysis methods for assessment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and *Plasmopara viticola* development in grapevine leaves: Application to the evaluation of resistance to downy mildew. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 235-244.
30. Koen, E., Trapet, P., Brule, D., Kulik, A., Klinguer, A., Atauri-Miranda, L., Meunier-Prest, R., Boni, G., Glauser, G., Mauch-Mani, B., Wendehenne, D. & Besson-Bard, A. (2014). beta-Aminobutyric acid (BABA)-induced resistance in *Arabidopsis thaliana*: link with iron homeostasis. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 27(11), 1226-1240.
31. Kuc, J. (2001). Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 7-12.
32. Lagrimini, L., Burkhart, M., Moyer, W. M. & Rothstein, S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7542-7546.
33. Lavanya, S. N., Raj, S. N., Udayashankar, A. C., Kini, K. R., Amruthesh, K. N., Niranjana, S. R. & Shetty, H. S. (2012). Comparative analysis of activities of vital defence enzymes during induction of resistance in pearl millet against downy mildew. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 45(11), 1252-1272.
34. Llorens, E., García-Agustín, P. & Lapeña, L. (2017). Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)*, 74(1), 90-100.
35. Luna, E., Beardon, E., Ravnskov, S., Scholes, J. & Ton, J. (2015). Optimizing Chemically Induced Resistance in Tomato Against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 100(4), 704-710.
36. Marcucci, E., Aleandri, M. P., Chilosi, G. & Magro, P. (2010). Induced resistance by  $\beta$ -aminobutyric acid in artichoke against white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology*, 158(10), 659-667.
37. Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* 67(21), 2318-2331.
38. Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K. K., Prakash, H. S., Niranjana, S. R. & Shekar, Sh. H. (2008). Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 188-194.
39. Oka, Y., Cohen, Y. & Spiegel, Y. (1999). Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid. *Phytopathology*, 89(12), 1138-1143.
40. Papavizas, F. (1964). Greenhouse control of *Aphanomyces* root rot of peas with aminobutyric acid and methylaspartic acid. *Plant Disease*, 48, 537-541.
41. Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. & Pertot, I. (2008). Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control*, 47(2), 228-234.
42. Raj, S. N., Sarosh, B. R. & Shetty, H. S. (2006). Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Plant Biology*, 33, 563-571.
43. Safdarpour, F., Khoda-karamian, Gh. & Soleymani-Pari, M. J. (2013). Induction of systemic resistance against blight disease of Cucumber Leaf margin using sodium silicate. *Journal of Plant Protection*, 36(1), 29-38. (in Farsi)
44. Siegrist, J., Orober, M. & Buchenauer, H. (2000).  $\beta$ -Aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to *tobacco mosaic virus* depends on the accumulation of salicylic acid. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(3), 95-106.
45. Silué, D., Nashaat, N. & Tirilly, Y. (1996). Differential responses of *Brassica oleracea* and *B. rapa* accessions to seven isolates of *Peronospora parasitica* at the cotyledon stage. *Plant Disease*, 80(2), 142-144.
46. Silue, D., Pajot, E. & Cohen, Y. (2002). Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid (BABA). *Plant Pathology*, 51(1), 97-102.
47. Simmons, C. R. (1994). The physiology and molecular biology of plant 1, 3- $\beta$ -D-glucanases and 1, 3; 1, 4- $\beta$ -D-glucanases. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(4), 325-387
48. Slaughter, A. R., Hamiduzzaman, M. M., Gindro, K., Neuhaus, J. M. & Mauch-Mani, B. (2008). Beta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1), 185-195.
49. Ton, J. & Mauch-Mani, B. (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal*, 38(1), 119-130
50. Ton, J., Jakab G., Toquin, V., Flors, V., Iavicoli, A., Maeder, M. N., Mataux, J. P. & Mauch-Mani, B. (2005). Dissecting the  $\beta$ -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(3), 987-999.

51. Wilkinson, S. W., Pastor, V., Paplauskas, S., Pétriacq, P. & Luna, E. (2018). Long-lasting  $\beta$ -aminobutyric acid-induced resistance protects tomato fruit against *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology*, 67(1), 30-41.
52. Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. & Chet, I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(11), 863-873.