

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تغییرات فیزیولوژیکی در گلابی بعد از مایه‌زنی با باکتری مولد (*Erwinia amylovora*) بیماری آتشک

مهسا باغبانی^۱، جواد عرفانی مقدم^{۲*} و خشنود نوراللهی^۲

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام.

۲- استادیاران گروه علوم باغبانی و گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام.

*مسئول مکاتبه J.erfani@ilam.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۶

چکیده

به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ارقام گلابی درگزی و ویلیام دوشس بعد از مایه‌زنی با باکتری مولد بیماری آتشک (*E. amylovora*)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. ارزیابی مقاومت بر اساس درصد نسبت پیشرفت بیماری آتشک در شاخه به کل طول شاخه صورت گرفت. برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (POX)، تجمع پراکسید هیدروژن و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی (TAC) قبل از تلقیح باکتری (زمان صفر) و سه، شش، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز بعد از مایه‌زنی با باکتری مولد بیماری آتشک به منظور تعیین نقش آنها در مکانیزم مقاومت بعد از حمله‌ی پاتوژن اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد کلیه‌ی پارامترهای بیوشیمیایی تحت تاثیر حمله‌ی پاتوژن قرار گرفتند. بیشتر پارامترهای بیوشیمیایی در رقم درگزی در مقایسه با رقم ویلیام دوشس، بعد از حمله‌ی پاتوژن افزایش معنی‌داری نشان دادند. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در رقم درگزی اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد با رقم ویلیام دوشس در طول دوره‌ی تلقیح داشت و در روزهای ششم تا دوازدهم بعد از تلقیح به حداکثر مقدار رسید. بررسی پیشرفت بیماری در سرشاخه‌ها نشان داد سرعت پیشرفت نکروز در سرشاخه‌ی گلابی در ارتباط با شاخص حساسیت رقم بود به طوریکه رقم ویلیام دوشس با شاخص حساسیت بیشتر، دارای سرعت نکروز بالاتری بود.

واژه‌های کلیدی: گلابی، آنزیم، شاخص‌های بیوشیمیایی، کاتالاز، پراکسید هیدروژن.

مقدمه

شود. وندر زوئیت و کیل (۱۹۷۹) حساسیت نسبی پنج گونه‌ی مهم گلابی را به بیماری آتشک مشخص کردند. آنها بیش از ۴۰۰ رقم گلابی را به لحاظ مقاومت به بیماری دسته بندی کردند. اهمیت این بیماری سبب گردید تا راهکارهایی برای کنترل آن جستجو شود اما تاکنون هیچ کدام از روش‌های مورد استفاده به طور قطعی موثر نبوده است. از جمله راه‌های مبارزه می‌توان به استفاده از ترکیبات شیمیایی آنتی‌بیوتیک، از بین بردن بافت‌های

بیماری آتشک یکی از بیماری‌های مخرب گیاهان در زیرتیره Pomoideae از تیره گلسرخیان به ویژه سیب (*Malus spp.*) و گلابی (*Pyrus spp.*) است. بیماری آتشک توسط باکتری *E. amylovora* القاء می‌شود و از جمله بیماری‌های بسیار خطرناک در نواحی معتدله در سراسر جهان است (وانسته ۲۰۰۰). اهمیت اقتصادی گلابی در بین محصولات میوه‌ای باعث شد تا تلاش‌هایی برای شناسایی ارقام و گونه‌های مقاوم به این بیماری آغاز

شامل بروز تغییراتی در میزان آنزیم‌های دفاعی گیاه مانند کاتالاز^۱، پراکسیداز^۲، پلی‌فنل اکسیداز^۳، آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز^۴ و ترکیبات دیگری از جمله فنل‌ها می‌باشد (میتلر ۲۰۰۲ و نوکتور و فویر ۱۹۹۸). در زمان تهاجم باکتری به گیاه، عامل بیماری‌زا با استراتژی‌های دفاعی میزبان، مانند تجمع عناصر تشکیل دهنده سدهای دفاعی، سنتز و ترشح مواد فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها، سنتز گلیکوپروتئین‌های غنی از اسیدآمین، تولید ترکیبات ضد میکروبی که مستقیماً مانع تهاجم عامل بیماری‌زا می‌شوند و با گروه‌های مختلف فعال اکسیژن بویژه سوپراکسید و هیدروژن پراکسید که توسط میزبان در محل حمله تولید می‌شوند، نیز روبرو خواهد شد. گروه‌های فعال اکسیژن باعث اکسید شدن ترکیبات داخل سلول از جمله چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند (استاکوایز و همکاران ۱۹۹۵). واکنش‌های دفاعی القا شده می‌توانند فقط در محلی که تحریک صورت گرفته اتفاق بیفتند (القای موضعی)، که تولید ترکیباتی مانند هیدروکسی پرولین‌ها، لیگنین و فیتوالکسین‌ها در محل تحریک و مرگ سریع سلول‌ها در محل ورود عوامل بیماری‌زا (واکنش فوق حساسیت) از جمله این موارد است. در صورتی که این واکنش‌ها در کل بافت و یا قسمت‌های مختلف گیاه تحریک شوند، موجب القاء سیستمیک می‌شوند (دیبی و شارما ۲۰۰۵). به دنبال این واکنش یک مقاومت اکتسابی در سلول‌های مجاور نقاط آلوده شده اتفاق می‌افتد که در اثر آن دیواره‌های سلولی تقویت شده و پروتئین‌های مختلف دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن^۵ فعال می‌شوند (سامسیچ و هندبراک ۱۹۹۸ و ون-لون و همکاران ۲۰۰۶). در شرایط طبیعی رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و سایر واکنش‌های متابولیکی غیر آنزیمی مانند ویتامین-

آلوده، کاربرد روش‌های به‌زراعی و استفاده از ارقام متحمل و مقاوم اشاره کرد (وندروژن و کیل ۱۹۷۹). داودی و همکاران (۱۳۸۴) با بررسی شدت آلودگی بیماری آتشک در ۴۳ رقم گل‌ابی از گونه *P. communis* موجود در کلکسیون بخش تحقیقات باغبانی موسسه‌ی اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، گزارش کردند که شدت آلودگی به طور معنی‌داری در بین ارقام مورد بررسی متفاوت است. بر اساس نتایج به دست آمده بین نمونه‌های مورد بررسی، رقم دوشس در گروه نیمه حساس قرار گرفت. عرفانی و همکاران (۱۳۹۲) حساسیت نسبی تعداد ۳۰ نمونه مهم گل‌ابی را به بیماری آتشک مشخص کردند و نتایج آنها نشان داد رقم گل‌ابی درگزی نسبت به این بیماری مقاوم است در حالیکه رقم دوشس در گروه خیلی حساس قرار گرفت. باکتری مولد بیماری آتشک به‌عنوان اولین باکتری بیماری‌زای شناخته شده گیاهی و پایه تحقیقات در زمینه باکتری‌شناسی گیاهی می‌باشد (وندروژن و کیل ۱۹۷۹). ورود باکتری به داخل گیاه اغلب از طریق گل‌ها یا زخم‌های موجود در برگ و شاخه‌ها صورت می‌گیرد. در ارقام حساس تکثیر و پیشرفت باکتری در سلول‌های پارانشیم صورت می‌گیرد و به دنبال آن بافت نکروز شده و گسترش پیدا می‌کند در حالی که در ارقام مقاوم بافت نکروز در نقطه آلوده شده محدود و متوقف می‌شود (ونیس و همکاران ۲۰۰۲). کلیه سلول‌های گیاهی از جمله سلول‌های فتوسنتزی توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی در برابر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد اکسیژن حفاظت می‌شوند و این باعث تحمل گیاهان به تنش‌ها می‌شود. این سیستم شامل مکانیسم‌های سم‌زدایی آنزیمی و غیر آنزیمی است که خسارت ناشی از رادیکال‌ها را تخفیف داده و یا ترمیم می‌کند (ژانگ و کیرکهام ۱۹۹۶ و فو و هانگ ۲۰۰۱). واکنش‌های بیوشیمیایی بعد از حمله‌ی باکتری به گیاه فعال می‌شود و در این هنگام بافت‌های گیاهی ترکیبات آنتی میکروبیال تولید می‌کنند (هامراسمیت و همکاران ۱۹۹۹). گیاهان دارای سازوکارهای ضد اکسیداسیونی در جهت کاهش اثر رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این سازوکارها

¹Catalase

²Peroxidase

³Polyphenol oxidase

⁴Phenylalanine ammonialyse

⁵Pathogenesis-related (PR)

موسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج فراهم گردید. به منظور تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح مورد نیاز، کشت شبگذران^۱ باکتری در دمای 25 ± 1 درجه‌ی سانتیگراد و در محیط لوریبرتانی آگار و به غلظت 10^8 (CFU/mL) در آب مقطر تنظیم گردید. غلظت بهینه مایه باکتری بر اساس آزمایش مقدماتی توسط عبداللهی و همکاران (۲۰۰۴) تعیین شد. برای تلقیح تقریباً یک میلی لیتر از محلول باکتری توسط سرنگ در جوانه انتهایی سرشاخه‌ها مایه‌زنی شد. بلافاصله پس از تلقیح باکتری، آبپاشی سرشاخه‌ها با مه-پاش حاوی آب مقطر انجام و کف گلخانه در طول زمان آزمایش با استفاده از آبپاش‌های متعدد مرطوب نگاه داشته شد. به منظور به حداقل رسانیدن فرار شاخه‌ها از آلودگی، مایه‌زنی مجدد سرشاخه‌ها ۱۲ ساعت بعد تکرار شد. ارزیابی تحمل به بیماری آتشک بر اساس صفت پیشرفت نکروز و بر اساس نسبت طول منطقه نکروزه شده به طول کل شاخه محاسبه شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار سه تایی و در مجموع ۹ نهال برای هر رقم انجام شد. در هر گلدان یک نهال وجود داشت و برای هر نهال چهار شاخه انتخاب شدند که با باکتری آلوده شدند. همچنین از هر رقم سه نهال به طور جداگانه به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند که آب مقطر به آنها تلقیح شد.

ارزیابی بیوشیمیایی

برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، گاپاکول پراکسیداز، تجمع پراکسید هیدروژن و ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در برگ نهال‌های شاهد و تیمار شده درگزی و ویلیام دوشس در روزهای صفر (قبل از آلودگی) سه، شش، ۹، ۱۲ و ۱۵ روز بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. به منظور استخراج این ترکیبات، نمونه برگ از زیر نقطه آلوده شده در گیاهان مذکور جمع‌آوری و بلافاصله در داخل نیتروژن مایع قرار گرفتند و در فریزر -80 درجه‌ی

های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌ها، به سرعت در سلول تجزیه می‌شوند (لیم و همکاران ۱۹۹۳ و کوتون و همکاران ۲۰۰۰). آزاد شدن رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش مستلزم این است که برخی واکنش‌های دفاعی در گیاه فعال شود (دوکه ۱۹۹۷). بیماری آتشک از جمله بیماری‌های شناخته شده است که تا کنون راه حل مناسبی برای کنترل آن ارائه نشده است. برای دستیابی به یک راهکار مناسب برای کنترل این بیماری، مطالعات اولیه در زمینه بیماری-زایی باکتری *E. amylovora* و بررسی مکانیزم‌های دفاعی گیاه میزبان ضروری است. با توجه به اینکه، بیماری آتشک به عنوان یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار شناخته شده و درخت گلابی یکی از حساس‌ترین میزبان‌های این بیماری محسوب می‌گردد، این آزمایش به منظور بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بافت بعد از القاء بیماری در دو رقم نسبتاً متحمل (درگزی) و نسبتاً حساس (ویلیام دوشس) انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش نهال‌های یکساله درگزی (متحمل به بیماری آتشک) و ویلیام دوشس (حساس به بیماری آتشک) در اوایل اسفندماه سال ۱۳۹۲ از موسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در گلدان‌های ۲۰ کیلویی حاوی مخلوطی از خاک، ماسه و خاکبرگ به نسبت‌های مساوی کاشته شد و به گلخانه دانشگاه ایلام با دمای 25 ± 5 درجه‌ی سانتیگراد، رطوبت ۷۰-۸۵٪، دارای سیستم خنک‌کننده و رطوبت ساز منتقل شدند. به منظور تحریک رشد شاخه‌های فرعی، کلیه‌ی نهال‌ها پس از انتقال به گلدان از ارتفاع ۷۰ سانتیمتری سربرداری و قبل از آلوده سازی دو ماه در این شرایط نگهداری شدند. پس از رشد شاخه‌ها به طول تقریبی ۳۰ الی ۴۵ سانتیمتر، تعداد چهار شاخه فرعی از هر نهال جهت آلودگی توسط باکتری مولد بیماری آتشک در نظر گرفته شد (عبداللهی و همکاران ۲۰۰۴). باکتری مولد بیماری آتشک (سویه Ea273) از

¹Overnight

میلی مولار (pH=۷/۵) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین^۳ یک درصد، EDTA^۴ یک میلی مولار و PMSF^۵ یک میلی مولار بود، سائیده شد. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه‌ی کاهش جذب پراکسید هیدروژن (کاهش مقدار پراکسید هیدروژن) در ۲۴۰ نانومتر و با روش هیندسا و موتوو (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار بود. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرو-لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط ذکر شده، واکنش شروع شد. میزان پراکسید هیدروژن موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی (mMol⁻¹ cm⁻¹ ε = ۴۰) و رابطه A = εbc محاسبه شد که نشان دهنده‌ی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد. در این رابطه، A معادل جذب خوانده شده، ε ضریب خاموشی، c غلظت پراکسید هیدروژن و b طول کوط (یک سانتی متر) می‌باشد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی برحسب مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده از روش بردفورد (۱۹۷۶) در یک دقیقه محاسبه گردید. سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از گایاکل و اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکل^۶ (حاصل اکسیداسیون گایاکل)، در طول موج ۴۷۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی-مولار (pH=۷)، پراکسید هیدروژن (۰/۳٪) و گایاکل (۱٪) می‌باشد. واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد آغاز گردید. با استفاده از تغییرات جذب در سه دقیقه در ۴۷۰ نانومتر، ضریب خاموشی تتراگایاکل (ε=۲۵/۵ mMol⁻¹ cm⁻¹) و رابطه A = εbc، مقدار تتراگایاکول تشکیل شده محاسبه گردید (پلوا و همکاران ۱۹۹۱). فعالیت آنزیم بر حسب واحد

سانتیگراد نگره‌داری شدند. مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش پراکسید هیدروژن با یدید پتاسیم و با روش آلکسیوا و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در تری‌کلرو استیک اسید^۱ ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره‌ی حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ، ۵۰۰ میکرو لیتر از روشناور با سمپلر به یک تیوپ جدید منتقل و به آن ۵۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی-مولار (pH=۷) و دو میلی لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها در ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه‌ی غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده گردید و نتایج به صورت میکرومول بر گرم وزن تر برگ ارائه شد. برای اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی از روش مون و ترائو (۱۹۹۸) استفاده شد. ابتدا دو گرم نمونه‌ی برگ تازه در پنج سی‌سی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۸) هموژنایزه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و روشناور جمع‌آوری شد. از روش به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل^۲ استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از روشناور به دست آمده با یک میلی لیتر محلول دی فنیل پیکریل هیدرازیل متانولی-آبی (۸۲ درصد) اضافه گردید و در یک محیط تاریک به مدت ۳۰ دقیقه نگره‌داری شدند. سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر نسبت به نمونه شاهد قرائت و ثبت شد. درصد زدودن دی فنیل پیکریل هیدرازیل از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

$$\% \text{ Scavengering} = 100 \times (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}$$

به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، ۰/۵

گرم از برگ تازه گیاه در ۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم

^۳PVP

^۴Ethylenediaminetetraacetic acid

^۵Phenylmethylsulfonyl fluoride

^۶Tetraquiacol

^۱TCA

^۲DPPH

اما پیشرفت بیماری در رقم درگزی بسیار کم و در روز ۱۵ به مقدار کمی مشاهده شد (شکل ۱). نتایج حاصل از تجزیه واریانس ترکیبات بیوشیمیایی بین دوره‌های مختلف ارزیابی در هر رقم نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سرعت پیشرفت بیماری و مقدار شاخص‌های بیوشیمیایی بین دوره‌های ارزیابی در رقم حساس و متحمل وجود دارد (جدول ۱). نتایج نشان داد الگوی فعالیت شاخص‌های بیوشیمیایی در دو رقم حساس (ویلیام دوشس) و متحمل (درگزی) روند مشابهی ندارد.

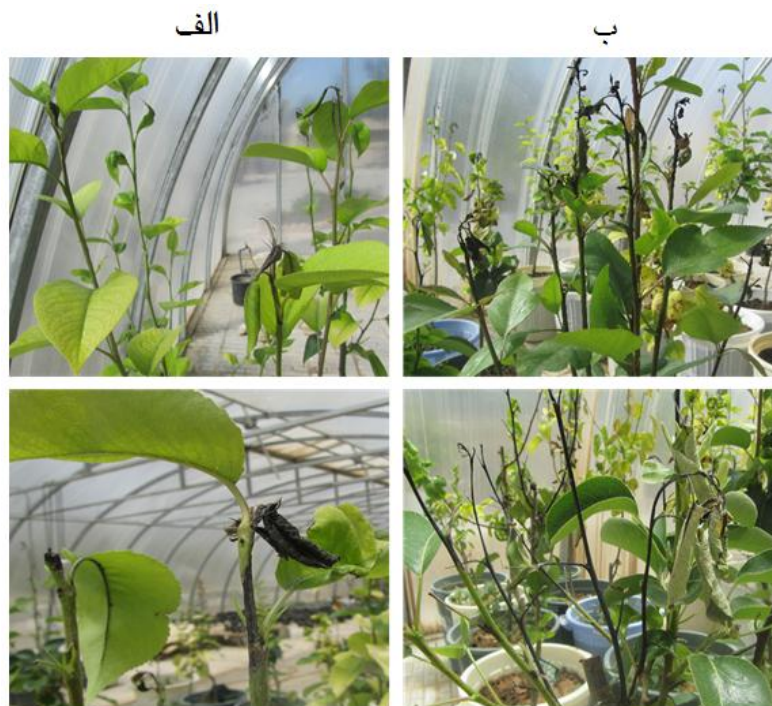
بررسی سرعت رشد بیماری در سرشاخه‌ها نشان داد در دو رقم گلابی، سرعت پیشرفت نکروز در ارتباط با شاخص حساسیت رقم بود. به این ترتیب که رقم ویلیام دوشس با شاخص حساسیت بیشتر، دارای سرعت نکروز بالاتری در مقایسه با رقم درگزی بود. میانگین سرعت پیشرفت بیماری در رقم درگزی و ویلیام دوشس بعد از القای آلودگی تا روز ۱۵ در شکل ۲ نشان داده شده است. بر طبق نتایج، سرعت پیشرفت بیماری در رقم ویلیام دوشس در مراحل مختلف ارزیابی نسبت به رقم متحمل درگزی بیشتر است. همچنین تفاوت معنی‌داری بین مراحل مختلف ارزیابی در رقم حساس ویلیام دوشس دیده شد. گسترش بیماری آتشک باعث تغییراتی در میزان پراکسید هیدروژن در نمونه‌های مورد بررسی گردید (جدول ۲). نتایج نشان داد بیشترین میزان پراکسید هیدروژن در سر-شاخه گلابی با میانگین $0/56$ میکرومول بر گرم وزن تر برگ در رقم ویلیام دوشس آلوده و کمترین میزان آن با میانگین $0/33$ میکرومول بر گرم وزن تر برگ در رقم درگزی شاهد حاصل گردید (جدول ۲). همچنین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن در طی زمان در سرشاخه در سطح احتمال یک درصد آماری معنی‌دار شد (جدول ۱). همراه با گسترش بیماری از زمان آلودگی، تجمع پراکسید هیدروژن در بافت دو رقم گلابی افزایش یافته است ولی نتایج نشان داد که بیشترین میزان پراکسید هیدروژن در سرشاخه گلابی رقم ویلیام دوشس

آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۲۰ میکرولیتر عصاره محاسبه شد (بردفورد، ۱۹۷۶). برای ارزیابی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، به عصاره‌های مربوط اسید آسکوربیک 10 میلی‌مولار افزوده گردید. سپس عصاره‌ها به مدت 20 دقیقه در $20000 \times g$ و در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفوژ شدند. از محلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت این آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم 50 میلی‌مولار ($PH=7$)، آسکوربات $0/5$ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن $0/15$ میلی‌مولار، EDTA $0/1$ میلی‌مولار و 50 میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. با استفاده از تغییرات جذب در طول موج 290 نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربات ($2.8 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ ، میزان آسکوربات برجای مانده پس از 2 دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد (ناکانو و آسادو ۱۹۸۱). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در 50 میکرولیتر عصاره محاسبه شد. برای سنجش غلظت پروتئین به روش بردفورد (۱۹۷۶)، به لوله‌های آزمایش حاوی 100 میکرو-لیتر عصاره‌ی پروتئینی، پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده شد و سریعاً ورتکس گردید. پس از 25 دقیقه، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد و رسم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج

بعد از القای باکتری، بروز علائم بیماری مانند بافت پژمرده و نکروزه در برگها و نوک ساقه در نهال‌های رقم ویلیام دوشس مشاهده شد در حالی که هیچ نشانه‌ای از آلودگی در نهال‌های رقم درگزی قابل مشاهده نبود. اولین علائم آلودگی در روز سوم در نهال‌های رقم ویلیام دوشس مشاهده شد و تا روز ۱۵ به سرعت گسترش یافت

آلوده شده به باکتری مولد بیماری آتشک با میانگین ۰/۷۵ میکرومول بر گرم وزن تر برگ در روز نهم مشاهده شد.



شکل ۱- پیشرفت بیماری آتشک بعد از القای باکتری در درگزی (الف) و ویلیامدوشس (ب)، (روز سوم- بالا و روز ۱۵- پایین).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر بیماری آتشک در طول زمان بر سرعت پیشرفت بیماری و صفات بیوشیمیایی در سرشاخه گلابی.

منابع تغییرات	درجه‌ی آزادی	پیشرفت بیماری	ظرفیت آنتی-اکسیدانت	پراکسید هیدروژن	آنزیم کاتالاز	آنزیم گایاکول پراکسیداز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز
رقم	۳	۱۶۲۹/۷**	۰/۰۴۹**	۰/۲۰۴**	۰/۰۳۳**	۰/۰۴**	۰/۹۳**
زمان	۵	۱۶۱/۳**	۰/۰۰۹**	۰/۰۱۳**	۰/۰۰۳**	۰/۰۰۹**	۰/۲۵**
رقم×زمان	۱۵	۱۴۹/۹**	۰/۰۵۷**	۰/۰۱۰**	۰/۰۰۴**	۰/۰۰۵**	۰/۲۱**
خطا	۴۸	۰/۴۰	۰/۰۸	۰/۰۳	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۴
CV(%)	-	۱۲/۹۹	۷/۹۳	۳/۸۴	۷/۴۰	۴/۱۱	۴/۸۸

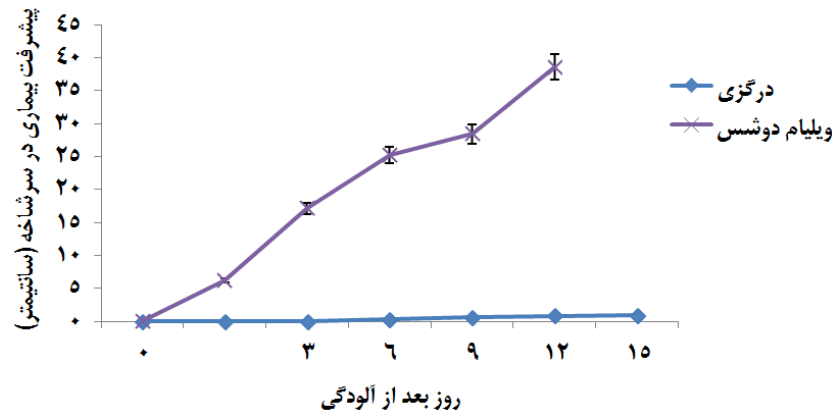
** : معنی دار در سطح ۱ درصد

به طوری که پس از القای آلودگی، بیشترین سطح ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در سرشاخه رقم درگزی آلوده با میانگین ۰/۵۰ درصد و کمترین میزان آن در رقم ویلیام دوشس شاهد با میانگین ۰/۳۹ درصد مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با نمونه آلوده شده همین رقم نداشت (جدول ۱ و ۲). بر اساس اطلاعات حاصله از جدول تجزیه

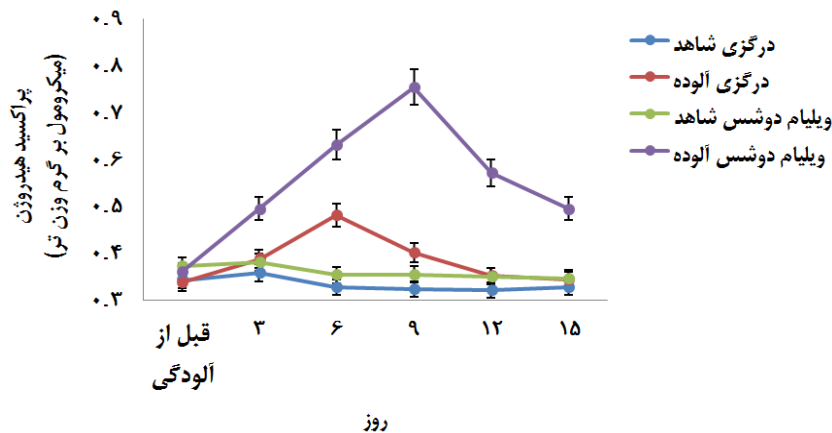
افزایش در تجمع پراکسید هیدروژن در رقم آلوده شده درگزی دارای شیب ملایم‌تری نسبت به رقم ویلیامدوشس بود و بیشترین مقدار آن در روز ششم ثبت شد (شکل ۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقدار ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی نشان داد حمله پاتوژن در نمونه‌های بررسی شده باعث تغییراتی در این شاخص می‌گردد

روز ششم در رقم درگزی آلوده شده با میانگین ۰/۶ درصد ثبت گردید در صورتی که در رقم ویلیام دوشس آلوده شده این شاخص افزایش موقتی داشت (شکل ۴).

واریانس مشخص شد اثر زمان‌های مختلف و اثرات متقابل بین زمان و رقم بر مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار می‌باشد. بیشترین مقدار این شاخص در طول زمان در



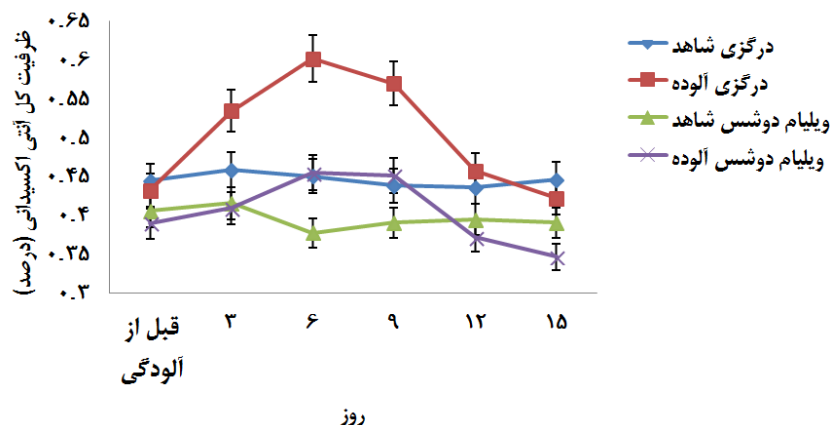
شکل ۲- مقایسه سرعت پیشرفت بیماری در سرشاخه‌های گلابی درگزی و ویلیام دوشس بعد از آلودگی با باکتری مولد بیماری آتشک.



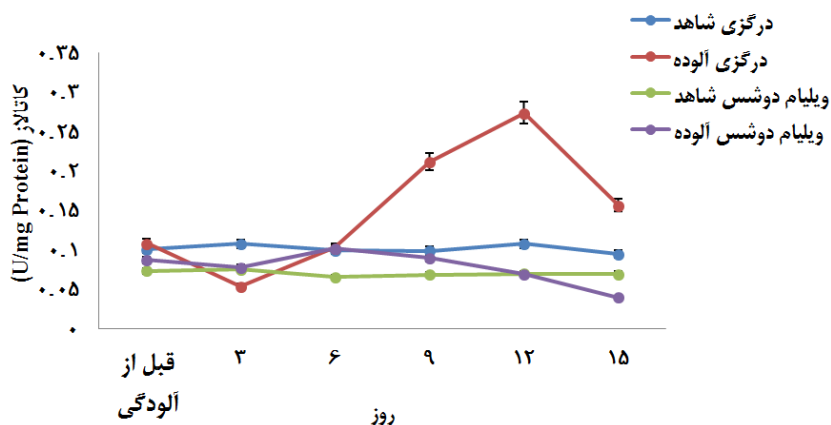
شکل ۳- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر میزان پراکسید هیدروژن در سرشاخه گلابی.

آتشک فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش معنی‌داری در روز سوم بعد از القای پاتوژن داشت اما بعد از آن به تدریج زیاد و در روز ۱۲ به حداکثر خود رسید (شکل ۵). در رقم حساس ویلیام دوشس روند تغییرات این آنزیم در طول زمان قابل توجه نبود.

در این مطالعه القای بیماری موجب افزایش معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح یک درصد آماری در سرشاخه آلوده شده گلابی درگزی در طول زمان گردید (جدول ۱ و ۲). نتایج حاصل از مقایسه اثر زمان‌های مختلف بر فعالیت این آنزیم در سرشاخه نشان داد در رقم مقاوم درگزی تلقیح شده توسط باکتری مولد بیماری



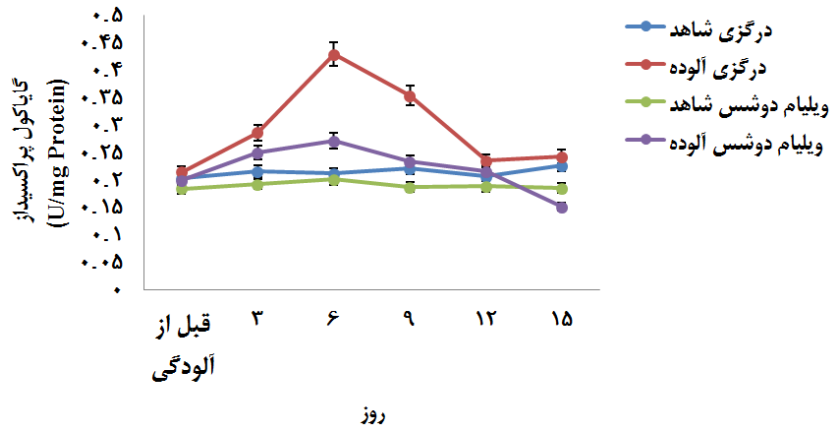
شکل ۴- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر میزان ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در سرشاخه گلابی.



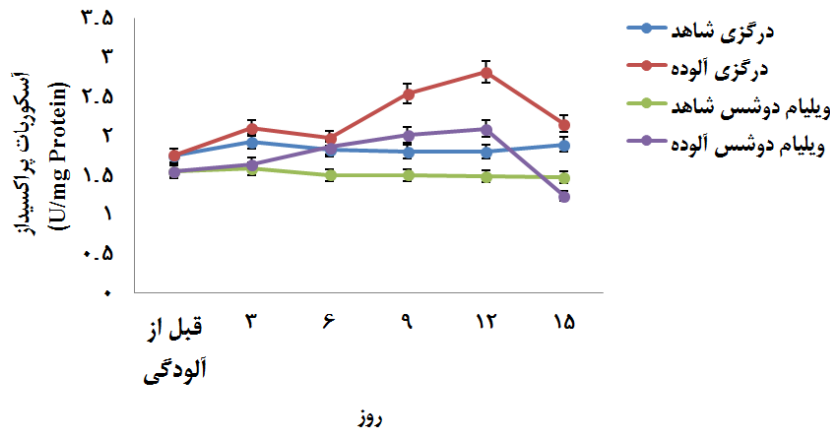
شکل ۵- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در سرشاخه گلابی.

به حداکثر مقدار خود در این رقم رسیده است در حالی که در رقم ویلیام دوشس آلوده شده روند افزایشی این آنزیم با شیب ملایم‌تری تا روز ششم انجام و بعد از روز ششم در هر دو رقم روند کاهشی داشت (شکل ۶). القاء باکتری مولد بیماری آتشک در هر دو نمونه آلوده شده گلابی درگزی و ویلیام دوشس باعث افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در طول زمان گردید اما روند افزایشی در رقم درگزی که یک رقم متحمل به بیماری آتشک است، بیش‌تر بود (شکل ۷).

نتایج مربوط به آنزیم گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سرشاخه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد آماری بین نمونه‌های مورد بررسی بود (جدول ۱). مقدار فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سرشاخه رقم درگزی آلوده دارای بیشترین مقدار (0.30 U/mg Protein) و در رقم ویلیام دوشس شاهد دارای کمترین مقدار (0.18 U/mg Protein) بود. همچنین بعد از القای بیماری، فعالیت این آنزیم در طول زمان در رقم درگزی آلوده شده افزایش و در روز ششم



شکل ۶- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در سرشاخه گلابی.



شکل ۷- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سرشاخه گلابی.

بحث

پیشنهاد شده است که مقاومت در برابر بیماری آتشک توسط عوامل پلی‌ژنی تعیین می‌شود (ونیسه و همکاران ۲۰۰۲). به طور کلی مقاومت در برابر بیماری آتشک در گیاهان میزبان ممکن است از طریق موانع فیزیکی و بیوشیمیایی صورت گیرد. موانع ساختاری یا فیزیکی از پیشرفت پاتوژن در بافت گیاه میزبان جلوگیری می‌کند اما واکنش‌های بیوشیمیایی بعد از نفوذ پاتوژن به گیاه فعال می‌شوند که منجر به سنتز ترکیبات فیتوآلکسین‌ها بعد از آلودگی می‌شود. برخی گیاهان برای جلوگیری از پیشرفت باکتری یک واکنش فوق حساسیت از خود نشان می‌دهند به طوری که مقدار زیادی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نقاط آلوده شده تولید و باعث مرگ سلول‌های اطراف می‌گردد

بیماری آتشک یکی از بیماری‌های مخرب گیاهان در زیرتیره دانه‌دارها از تیره گلسرخیان به ویژه سیب (*Malus spp.*) و گلابی (*Pyrus spp.*) است (وانسته ۲۰۰۰). گزارشات متعددی روی حساسیت و یا مقاومت نسبت به باکتری *E. amylovora* در بسیاری از گیاهان میزبان این باکتری به عنوان مثال در سیب (کربا و همکاران ۲۰۰۸)، گلابی (کربا و کودلا ۲۰۰۴)، گلابی و به (بل و همکاران ۲۰۰۴) و تمشک سیاه منتشر شده است. آنها نشان دادند سطوح مختلفی از مقاومت در بین گیاهان میزبان وجود دارد. در این بیماری برهمکنش بین گیاه و پاتوژن در ترکیب ژن‌های R/Avr صورت نمی‌گیرد و

می‌گردد. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم متحمل درگزی، نمایانگر توانائی این رقم جهت تحمل شرایط تنش است. با توجه به اینکه سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در سرشاخه رقم حساس ویلیام دوشس در مقایسه با رقم متحمل درگزی بسیار پایین است بنابراین تجمع رادیکال‌های آزاد در رقم حساس ویلیام دوشس بیشتر و احتمالاً آسیب اکسیداتیو نیز شدیدتر است.

محققین مختلفی گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در ارتباط با مقاومت به تنش‌های مختلف است. به-عنوان مثال اشری و محامد (۲۰۱۱) گزارش کردند فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ‌های آلوده شده گیاهان مقاوم کتان در اثر حمله‌ی عامل بیماری سفیدک پودری نسبت به ارقام حساس بیشتر است. همچنین نیبل و همکاران (۱۹۹۵) در گیاه سیب‌زمینی فعالیت آنزیم کاتالاز را تحت شرایط حمله نماد گزارش کردند. اسقروی و همکاران (۲۰۰۰) نیز با قرار دادن گیاهچه‌های دو رقم گندم در معرض تنش خشکی گزارش کردند که رقم مقاوم به تنش از فعالیت بالاتر آنزیم آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با رقم حساس برخوردار بود. در گیاهان، تعدادی از آنزیم‌ها مقادیر درون سلولی پراکسید هیدروژن را تنظیم می‌کنند اما آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به نظر می‌رسد که اهمیت بیشتری داشته باشند (مکریس و لشم ۱۹۹۴). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های گیاهی توانایی تبدیل پراکسید هیدروژن را به آب دارند و اثر سمیت پراکسید هیدروژن را خنثی می‌کنند (رضایی و فربدنیا ۲۰۰۸).

نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی القا شده بعد از القای باکتری مولد بیماری آتشک در رقم متحمل درگزی ممکن است به عنوان مکانیسم دفاعی ثانویه در قبال تنش اکسیداتیو باشند. به عنوان مثال آنزیم آسکوربات پراکسیداز همچنین یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در رفع سمیت پراکسید هیدروژن در سیتوزول و کلروپلاست محسوب می‌شود (میتووا و همکاران ۲۰۰۰). کامفنکل و مونتاکو (۱۹۹۵) به

(تن هاکن ۱۹۹۵). بعد از تشخیص باکتری، گیاهان دامنه‌ای از واکنش دفاعی را از خود نشان می‌دهند. در سلول‌های ابتدایی نقاط آلوده شده، مولکول‌های اکسیژن فعال با سرعت زیادی تولید می‌شود. همچنین مولکول‌های لیپید پراکسیده شده و به صورت ذرات یونی پخش می‌شوند (ونیس و همکاران ۲۰۰۱). مقدار پراکسید هیدروژن تولید شده در سلول نیز نشان دهنده‌ی تعادل بین تولید و تجزیه‌ی گونه‌های فعال اکسیژن در سلول می‌باشد و غلظت‌های بالای پراکسید هیدروژن به عنوان عامل ایجاد تنش اکسیداتیو به حساب می‌آیند (پاریدا و دس ۲۰۰۵). به طور کلی ارقام متحمل دارای ظرفیت بهتری جهت حفاظت خود در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش به واسطه نگه داری آنتی‌اکسیدان‌های بیشتر و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی تحت شرایط تنش دارند (باندگولا و همکاران ۲۰۰۴).

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که القای بیماری باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است. در رقم متحمل درگزی که با باکتری مولد بیماری آتشک آلوده شده بود، در روزهای اولیه بعد از حمله پاتوژن مقدار زیادی رادیکال آزاد از جمله پراکسید هیدروژن تولید می‌شود. بازدارندگی آنزیم کاتالاز باعث ایجاد یک واکنش فوق حساسیت در گیاه می‌گردد. در ارقام مقاوم، واکنش فوق حساسیت یک واکنش دفاعی موضعی و سریع است که منجر به مرگ سلول‌های ناحیه آلوده شده می‌گردد و از پیشرفت باکتری و گسترش آلودگی جلوگیری می‌شود. گزارش‌های متعددی در زمینه واکنش فوق حساسیت منتشر شده و واکنش‌هایی که در واکنش فوق حساسیت القاء می‌شوند، سبب بروز مقاومت می‌گردد (بنت ۱۹۹۶، هاموند-کوساک و جونز ۱۹۹۶، دورنر و همکاران ۱۹۹۷). در رقم حساس ویلیام دوشس مقدار رادیکال آزاد بعد از حمله پاتوژن بسیار بالا است، اما سیستم دفاعی و آنتی‌اکسیدانی گیاه به علت پایین بودن آنزیم‌های درگیر، قادر به حذف آنها نیست و باکتری با سرعت در داخل گیاه پیشرفت و در نهایت باعث مرگ گیاه

بیماری آتشک روند مشابهی ندارد. در این تحقیق همچنین تفاوت معنی‌داری در مقدار ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در میان نمونه‌های مورد بررسی بعد از تلقیح با باکتری مولد بیماری آتشک مشاهده شد. بعد از القای آلودگی، سطح این ترکیبات در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد بیشتر بود اما روند افزایشی آنها در رقم متحمل درگزی بیشتر بود. این تغییر و افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بعد از آلودگی ثابت می‌کند که این ترکیبات در ایجاد مقاومت به بیماری آتشک نقش مهمی دارند.

سپاسگزاری

هزینه‌های این پژوهش از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه ایلام تامین شده است که نگارندگان بدین‌وسیله مراتب قدرانی خود را ابراز می‌دارند.

صورت مشابهی گزارش کردند در کلروپلاست، آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سم زدایی پراکسید هیدروژن در گیاه تنباکو نقش زیادی دارد. در مطالعه‌ی مشابهی گزارش شد فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم مقاوم به خشکی گندم از فعالیت بالاتری در مقایسه با رقم حساس تحت شرایط شدید تنش خشکی برخوردار است (خان‌چوپرا و سلوت ۲۰۰۷).

نتایج کلی به دست آمده از این تحقیق تفاوت قابل توجهی را به لحاظ ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در دو رقم گل‌ابی نشان داد. بررسی سرعت رشد بیماری در سر-شاخه‌ها نشان داد در دو رقم مورد بررسی، سرعت پیشرفت نکروز در ارتباط با شاخص حساسیت رقم می‌باشد، به این ترتیب که رقم ویلیام دوشس با شاخص حساسیت بیشتر، دارای سرعت نکروز بالاتری بود. نتایج آنالیز شاخص‌های بیوشیمیایی نشان داد تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی در رقم حساس و مقاوم بعد از القای مولد

منابع

- داودی ع، مجیدی ا، رحیمیان ح و ولیزاده م، ۱۳۸۴. بررسی شدت آلودگی ارقام گل‌ابی به بیماری آتشک با استفاده از سیستم استاندارد USDA. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال ۹، شماره ۲. صفحه‌های ۱۶۸-۱۵۹.
- عرفانی ج، عبداللهی ح، عبادی ع و فتاحی مقدم م، ۱۳۹۲. ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک و نشانگرهای وابسته به آن در برخی ارقام گل‌ابی اروپایی و آسیایی. مجله به‌نژادی نهال و بذر، جلد ۲۹، شماره ۴. صفحه‌های ۶۷۲-۶۵۹.
- Abdollahi H, Rugini E, Ruzzi M and Muleo R, 2004. In vitro system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 203-212.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S and Karanov E, 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment* 24: 1337-1344.
- Ashry NA and Mohamed HI, 2011. Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and or susceptibility to *Powdery mildew*. *World Journal of Agricultural Sciences* 7: 78-85.
- Bandeoglu E, Eyidogan F, Yucel M and Oktem HA, 2004. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation* 42: 69-77.
- Bell AC, Ranney TG, Eaker TA and Sutton TB, 2004. Resistance to fire blight among flowering pears and quince. *HortScience* 40: 413-415.
- Bent AF, 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

- Dhindsa RS and Motowe W, 1981. Drought tolerance in two mosses: correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32: 79-91.
- Diby P and Sharma YR, 2005. *Pseudomonas fluorescens* mediated systematic resistance in black pepper (*Piper nigrum* L.) is driven through an elevated synthesis of defense enzymes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 38: 139-149.
- Doke N, 1997. The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 34: 785-813.
- Durner J, Shah J and Klessig DF, 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 2: 266-274.
- Fu J and Huang B, 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45: 105-114.
- Hammerschmidt R and Nicholson RL, 1999. A survey of plant defense responses to pathogens. Pp. 55-71 In: Agrawal AA, Tuzun S, Bent E (eds): *Induced Plant Defenses against Pathogens and Herbivores: Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. The American Phytopathological Society Press, St. Paul.
- Hammond-Kosack KE and Jones JD, 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Kampfenkel K, Van Montagu M and Inze D, 1995. Effects of iron excess on *Nicotiana plumbaginifolia* plants (implications to oxidative stress). *Plant Physiology* 107: 725-735.
- Khanna-Chopra R and Selote DS, 2007. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than-susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 60: 276-283.
- Korba J and Kudela V, 2004. Evaluation of the fire blight susceptibility of pear genotypes following inoculation. *Acta Fytotechnica et Zootechnica* 7: 144-146.
- Korba J, Sillerova J and Kudela V, 2008. Resistance of apple varieties and selections to *Erwinia amylovora* in the Czech Republic. *Plant Protect Science* 44: 91-96.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G and Sheen J, 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 2940-2945.
- Lim YS, Cha MK, Kim HK, Uhm TB, Park JW, Kim K and Kim IH, 1993. Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192: 273-280.
- McKersie BD and Leshem Y, 1994. *Stress and stress coping in cultivated plants*. Springer Science and Business Media.
- Mittler R, 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittova V, Volokita M, Guy M and Tal M, 2000. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative *Lycopersi conpennellii*. *Physiology Plant* 110: 42-51.
- Moon JH and Terao J, 1998. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low density lipoprotein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 5062-5065.
- Nakano Y and Asado K, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.

- Niebel A, Heungens K, Barthels N, Inze D, Van Montagu M and Gheysen G, 1995. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8: 371-378.
- Noctor G and Foyer CH, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 49: 249-279.
- Parida AK and Das AB, 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox Environ Safe* 60: 324-349.
- Plewa MJ, Smith SR and Wanger ED, 1991. Diethyl dithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutant Research* 247: 57-64.
- Rezai K and Farboodnia T, 2008. Manganese toxicity effects on chlorophyll content antioxidant enzymes in pea plant (*Pisum sativum* L. cv qazvin). *Agricultural Journal* 3: 454-458.
- Sgherri CLM, Maffei M and Navari-Izzo F, 2000. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. *Journal of Plant Physiology* 157: 273-279.
- Somssich IE and Hahlbrock K, 1998. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3: 86-90.
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG and Jones JD, 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-661.
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA and Lamb C, 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 4158-4163.
- Van Loon LC, Rep M and Pieterse CMJ, 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Vander-Zwet T and Keil HL, 1979. Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants. U.S.D.A. Handbook.
- Vanneste JL (eds), 2000. Fire blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. CABI Pub., Wallingford, UK.
- Venisse JS, Gullner G and Brisset MN, 2001. Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology* 125: 2164-2172.
- Venisse JS, Malnoy M, Faize M, Paulin JP and Brisset MN, 2002. Modulation of defense responses of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 1204-1212.
- Zhang J and Kirkham MB, 1996. Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower. *Plant Science* 113: 139-147.

Evaluation of Antioxidant Activity and Physiological Changes in Pear After Inoculation by *Erwinia amylovora*, Causing Agent of Fire Blight Disease

M Baghbani¹, J Erfani Moghadam^{2*} and Kh Nourollahi²

¹Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

²Assistant Professors, Department of Horticultural Science and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

*Corresponding author: J.erfani@ilam.ac.ir

Received: 17 Dec 2015

Accepted: 19 Feb 2017

Abstract

In order to evaluate the antioxidant activity in the pear cultivars including Dargazi and William Duchesse after inoculation with *E. amylovora*, an experiment carried out in factorial randomized complete block design with three replications. The resistance level has been determined with calculation of the length of lesion to the overall sheet length percentage. In order to find out the plant resistance mechanisms to the pathogen, ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POX), H₂O₂ accumulation and total antioxidant capacity (TAC) were measured at zero, 3, 6, 9, 12 and 15 days after the inoculation by *E. amylovora*. According to the data obtained all biochemical parameters are affected by pathogen attack. In addition, most of the biochemical parameters showed a significant increase on the leaves of Dargazi cultivar compared with William Duchesse cultivar after pathogen infection. Catalase and peroxidase enzymes activity in the Dargazi cultivar were significantly different ($P \leq 0.01$) with William Duchesse cultivar during inoculation, and the highest activity were obtained at the sixth to 12 days after the treatment. Investigation of disease progression in shoot showed that the progression rate of necrosis in pear shoots was related with index of varietal susceptibility, so that William Duchesse with high index of varietal susceptibility, had higher rate of necrosis.

Keywords: Pear, Enzyme, Biochemical index, Catalase, H₂O₂.