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

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 دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱

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

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 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 می توان به استفاده از ترکیبات شیمیایی آنتی‌بیوتیک، از بین بردن بافت‌های

آلوده، کاربرد روش‌های به‌زراعی و استفاده از ارقام متحمل و مقاوم اشاره کرد (وندر زوئیت 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 (وندر-زوئیت 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 (ونیسه 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 ۱۹۹۶و 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 شامل بروز تغییراتی در میزان آنزیم‌های دفاعی گیاه مانند کاتالاز[1]، پراکسیداز[2]، پلی‌فنل اکسیداز[3]، آنزیم فنیل آلانین آمونیالایز[4] 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 اسیدآمینه، 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 فیتوآلکسین‌ها 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 می شوند (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[5] 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-

[1]Catalase
[2]Peroxidase
[3]Polyphenol oxidese
[4]Phenylalanine ammonialyse
[5]Pathogenesis-related (PR)

های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین‌ها، به سرعت در سلول تجزیه می‌شوند (لیم و همکاران ۱۹۹۳و 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 گلدان های ۲۰ کیلویی حاوی مخلوطی از خاک، ماسه و خاکبرگ به نسبت‌های مساوی کاشته شد و به گلخانه دانشگاه ایلام با دمای ۵±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰-۸۵٪، دارای سیستم خنک کننده 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 موسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج فراهم گردید. به منظور تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح مورد نیاز، کشت شبگذران[1] باکتری در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتیگراد و در محیط لوریابرتانی 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 تقریبا 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 آب‌مقطر 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 کاملا 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، گایاکول 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 ۸۰- درجه‌ی

[1]Overnight

سانتیگراد نگه‌داری 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[1] 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 میلی‌لیتر 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 ۳۹۰ 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 میلی‌مولار (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[2] 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 نگه‌داری 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:

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

به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، ۰/۵ گرم از برگ تازه گیاه در ۵ میلی‌لیتربافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵) که حاوی پلی وینیل پیرولیدین[3] یک درصد، EDTA[4] یک میلی‌مولار و PMSF[5] یک میلی‌مولار 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 میلی‌مولار (pH=۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار 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 ($mMol^{-1}cm^{-1}$ ۴۰= ε) و رابطه $A= \varepsilon bc$ 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 کوت (یک سانتی‌متر) می‌باشد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی برحسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) 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[6] (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 ($mMol^{-1}cm^{-1}$ ۲۵/۵=ε) و رابطه $A= \varepsilon bc$، مقدار تتراگایاکول تشکیل شده محاسبه گردید (پلوا و همکاران ۱۹۹۱). فعالیت آنزیم بر حسب واحد

[1]TCA
[2]DPPH
[3]PVP
[4]Ethylenediaminetetraacetic acid
[5]Phenylmethylsulfonyl fluoride
[6]Tetraguiacol

آنـزیم در مقـدار پـروتئین کـل (میلـی‌گـرم) موجـود در ۲۰ میکرولیتر عصاره محاسبه شد (بردفورد، ۱۹۷۶).

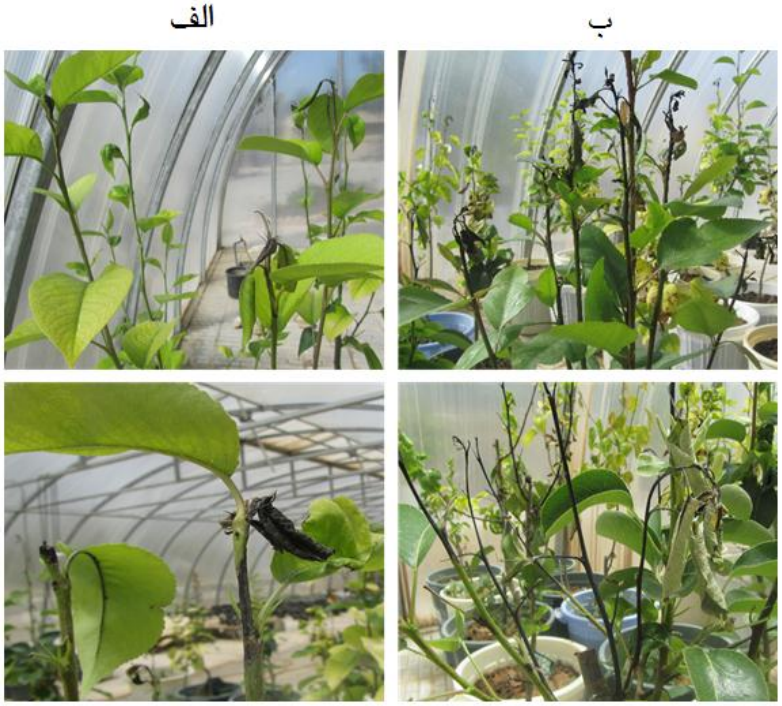
برای ارزیابی فعالیت آنزیم آسـکوربات پراکسـیداز، بـه عصاره‌های مربوط اسید آسکوربیک ۱۰ میلی‌مولار افزوده گردید. سپس عصاره‌ها به مـدت ۲۰ دقیقـه در g×۲۰۰۰۰ و در دمای ۴°C سانتریفوژ شدند. از محلـول شـفاف رویـی برای سنجش فعالیت این آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش شـامل بـافر فسـفات پتاسـیم ۵۰ میلـی‌مـولار (PH=۷)، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۰/۱۵ میلـی-مولار، EDTA ۰/۱ میلـی‌مـولار و ۵۰ میکـرولیتـر عصـاره آنزیمی بود. با استفاده از تغییرات جذب در طول مـوج ۲۹۰ نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربات ($2.8\ mMol^{-1}cm^{-1}$) و فرمول $A= \varepsilon bc$، میزان آسکوربات برجای مانده پـس از ۲ دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد (ناکانو و آسادو ۱۹۸۱). فعالیـت آنـزیم بـر حسـب واحـد آنـزیم در مقـدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۵۰ میکـرولیتـر عصـاره محاسـبه شـد. بـرای سـنجش غلظـت پـروتئین بـه روش بردفورد (۱۹۷۶)، به لوله‌های آزمایش حـاوی ۱۰۰ میکـرو-لیتر عصاره‌ی پروتئینی، پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افـزوده شد و سریعاً ورتکس گردید. پس از ۲۵ دقیقه، جـذب آن بـا دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتـر خوانـده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید. آنالیز داده‌ها با اسـتفاده از نـرم‌افـزار آمـاری SAS صورت گرفت. مقایسـه میـانگین‌هـا بـا اسـتفاده از آزمـون LSD در سـطح احتمـال یـک درصـد و رسـم شـکل‌هـا بـا استفاده از نرم‌افزار Excel انجام پذیرفت.

نتایج

بعد از القای باکتری، بـروز علائـم بیمـاری ماننـد بافـت پژمرده و نکروزه در برگها و نوک ساقه در نهال‌هـای رقـم ویلیام دوشس مشاهده شد در حـالی کـه هـیچ نشـانه‌ای از آلودگی در نهال‌های رقم درگزی قابل مشاهده نبـود. اولـین علائـم آلـودگی در روز سـوم در نهـال‌هـای رقـم ویلیـام دوشس مشاهده شد و تا روز ۱۵ به سرعت گسترش یافـت اما پیشرفت بیماری در رقـم درگـزی بسـیار کـم و در روز ۱۵ به مقدار کمی مشاهده شـد (شـکل ۱). نتـایج حاصـل از تجزیه واریانس ترکیبات بیوشیمیایی بین دوره‌های مختلف ارزیـابی در هـر رقـم نشـان داد کـه تفـاوت معنـی‌داری در سرعت پیشرفت بیماری و مقدار شاخص‌هـای بیوشـیمیایی بین دوره‌هـای ارزیـابی در رقـم حسـاس و متحمـل وجـود دارد (جدول ۱). نتایج نشان داد الگوی فعالیت شاخص‌هـای بیوشیمیایی در دو رقم حساس (ویلیام دوشـس) و متحمـل (درگزی) روند مشابهی ندارد.

بررسی سرعت رشد بیماری در سرشاخه‌ها نشـان داد در دو رقم گلابـی، سـرعت پیشـرفت نکـروز در ارتبـاط بـا شاخص حساسیت رقم بود. به این ترتیـب کـه رقـم ویلیـام دوشس با شاخص حساسیت بیشتر، دارای سرعت نکـروز بالاتری در مقایسه با رقـم درگـزی بـود. میـانگین سـرعت پیشرفت بیماری در رقم درگـزی و ویلیـام دوشـس بعـد از القای آلودگی تا روز ۱۵ در شکل ۲ نشان داده شـده اسـت. بر طبـق نتـایج، سـرعت پیشـرفت بیمـاری در رقـم ویلیـام دوشس در مراحل مختلف ارزیابی نسـبت بـه رقـم متحمـل درگزی بیشتر است. همچنین تفاوت معنی‌داری بین مراحل مختلف ارزیابی در رقم حساس ویلیام دوشـس دیـده شـد. گسترش بیماری آتشک باعث تغییراتی در میـزان پراکسـید هیدروژن در نمونه‌های مـورد بررسـی گردیـد (جـدول ۲). نتایج نشان داد بیشترین میزان پراکسید هیدروژن در سـر-شاخه گلابی با میانگین ۰/۵۶ میکرومول بـر گـرم وزن تـر برگ در رقم ویلیام دوشس آلوده و کمتـرین میـزان آن بـا میانگین ۰/۳۳ میکرومـول بـر گـرم وزن تـر بـرگ در رقـم درگزی شاهد حاصل گردید (جـدول ۲). همچنـین داده‌هـای حاصل از انـدازه‌گیـری مقـدار پراکسـید هیـدروژن در طـی زمان در سرشـاخه در سـطح احتمـال یـک درصـد آمـاری معنی‌دار شد (جدول ۱). همراه با گسترش بیماری از زمـان آلودگی، تجمع پراکسید هیدروژن در بافـت دو رقـم گلابـی افزایش یافته است ولی نتایج نشان داد که بیشـترین میـزان پراکسید هیدروژن در سرشاخه گلابی رقم ویلیام دوشـس

آلوده شده به باکتری مولد بیماری آتشک با میـانگین 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).

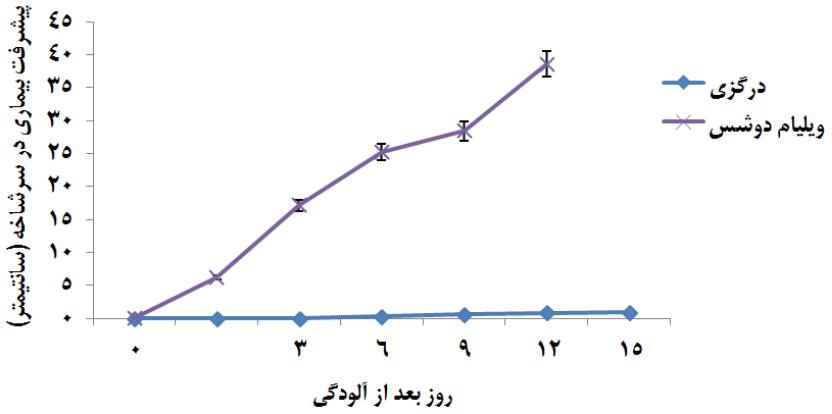
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر بیماری آتشک در طول زمان بر سرعت پیشرفت بیماری و صفات بیوشیمیایی در سرشاخه گلابی.

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

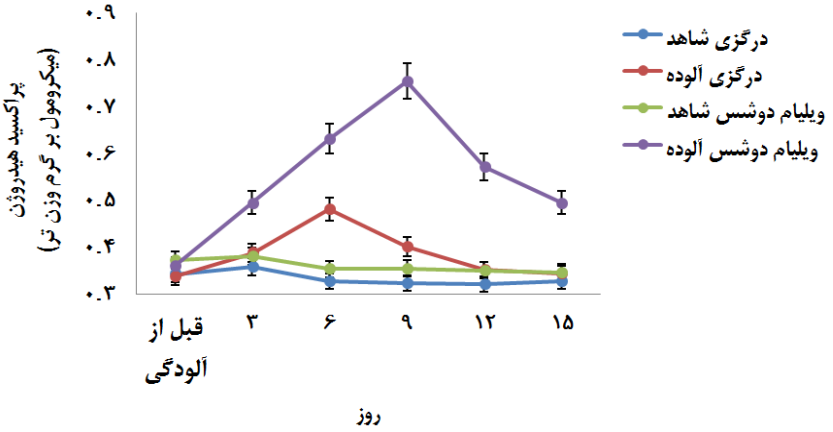
**: معنی‌دار در سطح ۱ درصد

افزایش در تجمع پراکسـید هیـدروژن در رقـم آلـوده شـده درگزی دارای شیب ملایم‌تری نسبت به رقم ویلیام‌دوشـس بود و بیشترین مقدار آن در روز ششم ثبت شد (شـکل ۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط بـه مقـدار ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی نشان داد حمله پاتوژن در نمونه-های بررسی شده باعث تغییراتی در این شاخص می‌گـردد به طوری که پس از القای آلودگی، بیشترین سطح ظرفیـت کـل آنتـی‌اکسـیدانی در سرشـاخه رقـم درگـزی آلـوده بـا میانگین ۰/۵۰ درصد و کمتـرین میـزان آن در رقـم ویلیـام دوشس شاهد بـا میـانگین ۰/۳۹ درصـد مشـاهده شـد کـه تفاوت معنی‌داری با نمونه آلوده شـده همـین رقـم نداشـت (جداول ۱ و ۲). بر اساس اطلاعات حاصله از جدول تجزیـه

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 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).

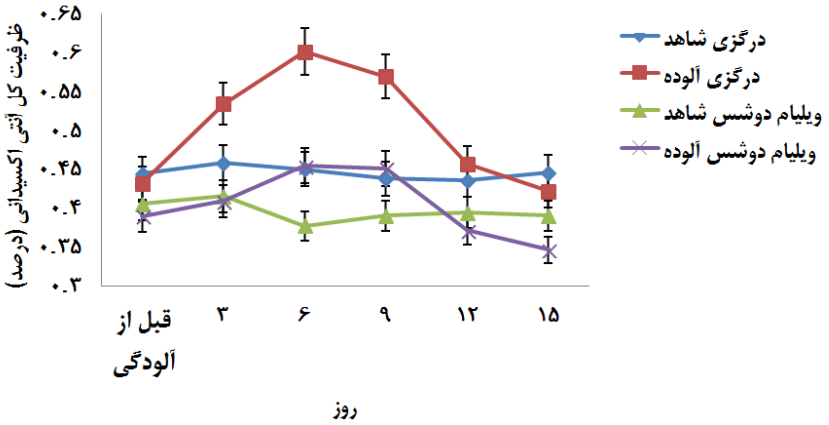


شکل ۲- مقایسه سرعت پیشرفت بیماری در سرشاخه‌های گلابی درگزی و ویلیام دوشس بعد از آلودگی با باکتری مولد بیماری آتشک.

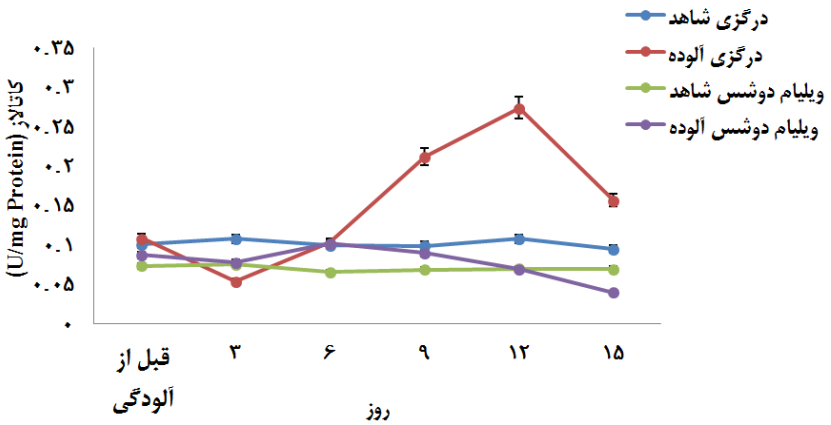


شکل ۳- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر میزان پراکسید هیدروژن در سرشاخه گلابی.

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 (جداول ۱ و ۲). نتایج حاصل از مقایسه اثر زمان های مختلف بر فعالیت این آنزیم در سرشاخه نشان داد در رقم مقاوم درگزی تلقیح شده توسط باکتری مولد بیماری 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.

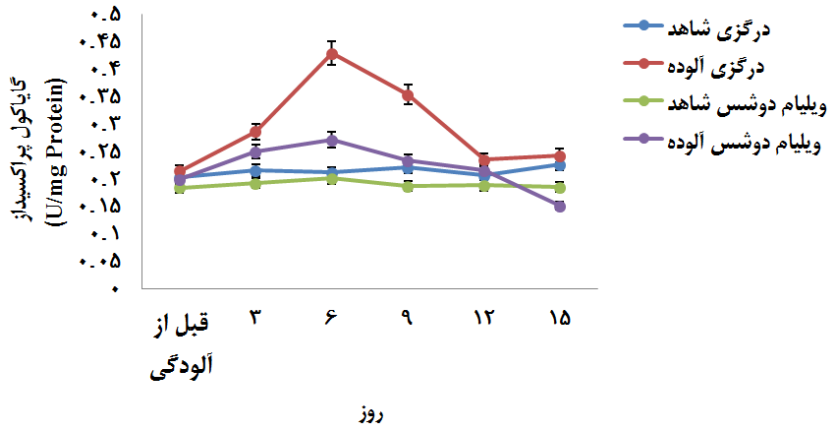


شکل ۴- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر میزان ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی در سرشاخه گلابی.

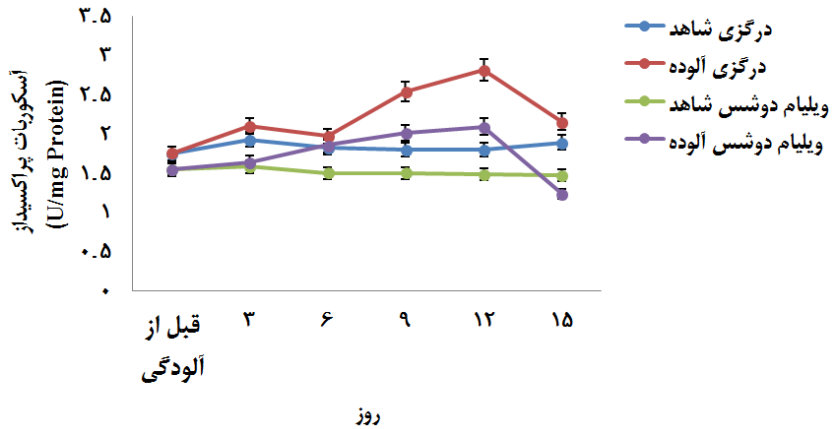


شکل ۵- برهمکنش اثر بیماری آتشک و زمان بر مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در سرشاخه گلابی.

نتایج مربوط به آنزیم گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سرشاخه نشان دهنده وجود اختلاف معنی-داری در سطح احتمال یک درصد آماری بین نمونه های 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 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).



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

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 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

(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 (ونیسه 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 آنتی‌اکسیدانی 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 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. به‌عنوان 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 نماتد گزارش کردند. اسقری 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 می کنند اما آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به نظر می‌رسد که اهمیت بیشتری داشته باشند (مکریس و لشم ۱۹۹۴). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول های گیاهی توانایی تبدیل پراکسید هیدروژن را به آب دارند و اثر سمیت پراکسید هیدروژن را خنثی می کنند (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 و مونتاگو (۱۹۹۵) به

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 (خاناچوپرا 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 می-باشد، 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 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.

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 Baghbani[1], J Erfani Moghadam[2*] and Kh Nourollahi[2]

[1]Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.
[2]Assistant 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), H_2O_2 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, H_2O_2.