Archive of SID

خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز جدایه (IKO6) قارچ *Ascochyta rabiei* : عامل بیماری برق زدگی در نخود

حسین فلاحی[۱]، مصطفی مطلبی[۲] و محمدرضا زمانی[۲]

چکیده

بیماری برق زدگی (Ascochyta blight) در نخود (*Cicer arientinum*) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه می‌باشد که توسط قارچ *Ascochyta rabiei* ایجاد می‌گردد و خسارات زیادی را به این محصول وارد میسازد. آنزیم پلی گالاکتوروناز یکی از عوامل مهم در بیماریزایی این قارچ محسوب می‌شود که با تخریب ترکیبات ساختمانی دیواره سلولی گیاه باعث سست شدن و نفوذ پذیرشدن آن نسبت به پاتوژن می‌گردد. در این تحقیق جهت بررسی خصوصیات آنزیم پلی گالاکتوروناز تولید شده توسط جدایه IK06 قارچ *A. rabiei* اقدام به خالص سازی این آنزیم با استفاده از ستون تعویض یونی بر روی بستر (Carboxy Methyl Sepharose) گردید. مناسب‌ترین pH جهت اتصال آنزیم مذکور به بستر ستون برابر ۵/۵ تعیین گردید. پس از اتصال پروتئین، شستشوی ستون و اعمال شیب غلظت نمک NaCl یک مولار، نتایج نشان داد در فراکسیون‌های ۸۱ تا ۹۶ در ناحیه غلظت نمکی بین ۰/۳ تا ۰/۴ مولار یک قله فعالیت آنزیمی مشاهده می‌گردد. پس از رسوب دهی پروتئین‌های فراکسیون‌های فوق و با استفاده از SDS-PAGE یک باند پروتئینی با جرم ملکولی حدود ۲۷ کیلودالتون به‌دست آمد. مطالعه زایموگرام مربوط به این باند پروتئینی نشان داد که این پروتئین دارای فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز می‌باشد. بررسی pH مناسب برای فعالیت آنزیمی نشان داد که پروتئین خالص شده، در pH برابر ۷/۵ بالاترین فعالیت آنزیمی را از خود نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، خالص‌سازی، بیماری برق‌زدگی و نخود

مقدمه

یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها در نخود (*Cicer arientinum*) بیماری برق زدگی می‌باشد که عامل آن قارچ *Ascochyta rabiei* بوده و میزان خسارت وارده به گیاه نخود توسط این قارچ در بعضی از مزارع حتی تا صد در صد نیز گزارش شده است (۱۹ و ۲۳). این بیماری اولین بار توسط باتلر در سال ۱۹۱۱ در ایالت مرزی شمال غربی پاکستان گزارش و توصیف گردید (۵). از آن زمان، این بیماری در بیش

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم سلولی ملکولی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲. استادان ژنتیک مولکولی و بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

www.SID.ir

Archive of SID

از ۳۲ کشور جهان گزارش شده است (۲۳ و ۲۴). بیماری برق زدگی نخود برای اولین بار در ایران توسط زالپور گزارش گردیده (۳۵) و تاکنون این بیماری در مناطق مختلفی از ایران مانند استان‌های آذربایجان، مازندران، مرکزی، خوزستان، خراسان، ایلام، همدان و کرمانشاه مشاهده شده است (۱ و ۳۴). ماهیت مخرب قارچ *A. rabiei* آن را به‌عنوان یک فاکتور اصلی محدود کننده تولید نخود و به‌عنوان مهم‌ترین عامل بیماری نخود معرفی نموده است (۳۱).

جهت ورود پاتوژن‌ها از محیط خارج به داخل گیاه و هم‌چنین نفوذ در بافت‌های مختلف، برخی از آنها قادرند آنزیم‌هایی تولید نمایند که ترکیبات دیواره سلولی گیاه را تخریب نموده یا استحکام آن را کاهش دهند (۳). دیواره های سلولی گیاه ساختمان‌های منظم و پیچیده‌ای هستند که به عنوان اولین سد فیزیکی در برابر حمله پاتوژن ایستادگی می‌کنند و نفوذ در این سد جهت آلوده شدن گیاه توسط پاتوژن لازم است. هر گونه آسیب به تیغه میانی دیواره سلولی، مخصوصا در بافت‌های سطحی، می‌تواند منجر به از بین رفتن اتصالات بین سلولی شود که در نهایت زمینه نفوذ بیشتر را در بافت‌های عمقی‌تر فراهم می‌آورد. این گونه آسیب‌ها در بیماری‌هایی مانند پژمردگی (Damping-off)، پوسیدگی نرم و خشک ریشه‌ها (Soft and dry root rot)، ضایعات برگ و ساقه (Leaf and stem lesions) مشاهده شده است (۹). در طبیعت یکی از اولین واکنش‌های ملکولی بین پاتوژن و میزبان، اثر آنزیم‌های تولید شده توسط پاتوژن بر دیواره سلولی میزبان می‌باشد. در این فرایند پلی ساکاریدهای دیواره سلولی (بخصوص پکتین) توسط این آنزیم‌ها تخریب می‌گردد (۱۰). این آنزیم‌ها معمولاً ترشحی بوده و دارای وزن ملکولی پایین و پایداری نسبتاً بالایی هستند. آنزیم‌های مذکور به‌صورت ایزوآنزیم‌های مختلفی تولید می‌شوند که از نظر اندازه، بار الکتریکی، پایداری و توانایی برای تخریب دیواره‌های سلول مختلف هستند (۱۰). این آنزیم‌ها نه تنها باعث تخریب دیواره سلولی می‌گردند، بلکه ممکن است پروتوپلاست را نیز از بین ببرند.

جداسازی و تخلیص آنزیم با هدف عمده به‌دست آوردن آنزیم خالص جهت مطالعه خصوصیات آنزیمی انجام می‌شود. اطلاعات موجود نشان می‌دهد که روش‌های مختلفی جهت خالص‌سازی و نیز تعیین خصوصیات آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های مختلف از جمله *Fusarium oxysporum*, *Botirytis cinerea*, *Thermomyces lanuginosus* مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱، ۲۲، ۲۹، ۳۰ و ۳۳). با توجه به اهمیت نقش آنزیم پلی گالاکتوروناز در بیماری‌زایی قارچ *F. oxysporum* در گیاه نخود (*Cicer arientinum*)، در این تحقیق برای به‌دست آوردن آنزیم خالص جهت مطالعه خصوصیات ملکولی، از ستون تعویض یونی (CM-Sepharose Fast Flow) استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

جدایه قارچ و محیط‌های کشت

جدایه قارچ *Ascochyta rabiei* (IK06) که در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت از منطقه ماهیدشت در استان کرمانشاه جمع آوری و خالص سازی گردیده است (۳۶).

برای نگه‌داری قارچ از محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) استفاده گردید. برای فراهم نمودن شرایط مناسب جهت تولید آنزیم‌های پکتینی توسط قارچ *A. rabiei* از محیط کشت تغییر یافته زایموگرم (Pectic Zymogram medium, PZ) استفاده گردید (۳۷). بدین منظور ده گرم پکتین (Citrus pectin, Merck) در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و ۲/۶۴ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۳۴ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات و۰/۱۴ گرم سولفات منیزیم اضافه شد. pH محیط فوق برابر ۴/۵ تنظیم گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز

فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز با استفاده از روش کالمر (۸) همراه با تغییراتی، به شرح زیر اندازه‌گیری گردید. ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۲۱۰ میکرولیتر محلول ذخیره

www.SID.ir

Archive of SID

سوبسترا حاوی ۰/۳درصد (w/v) پلی گالاکتورونیک اسید در لوله اپندورف مخلوط شده و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. واکنش با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر معرف مس [۱٪ (w/v) سدیم پتاسیم تارتارات، ۲٪ (w/v) کربنات سدیم، ۰/۳٪ (w/v)، سدیم هیدروژن کربنات و ۱۴٪ (w/v) سولفات سدیم] و نیز قرار دادن در حمام آب جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. پس از سرد شدن ۵۰۰ میکرولیتر معرف آرسنومولیبدات [۵٪ (w/v) آمونیم مولیبدات، ۰/۶٪ (w/v) دی سدیم هیدروژن آرسنات و ۴/۲٪ (v/v) اسید سولفوریک ۹۶٪] به مخلوط اضافه و سانتریفوژ شده (۱۲۰۰۰ rpm) و میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم برای هر جدایه در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش از دی- گالاکتورونیک اسید (D-Galacturonic acid sodium salt, Fluka) به‌عنوان استاندارد استفاده شد. در این شرایط یک واحد آنزیم در مدت ۲۰ دقیقه تشکیل یک میکرومول دی گالاکتورونیک اسید را می‌دهد.

کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی بستر (CM-Sepharose Fast Flow)

جهت خالص کردن آنزیم یک ستون کروماتوگرافی به ابعاد ۲۵×۲ سانتی‌متر (ارتفاع × قطر) انتخاب گردید. مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از بستر CM-Sepharose Fast Flow که به‌صورت تجاری و به فرم سوسپانسیون می باشد (Pharmacia)، درون بشر ریخته و بر روی آن بافر متعادل کننده (استات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH برابر۵/۵) اضافه گردید. پس از چند بار تعویض بافر، بستر به کمک یک میله شیشه‌ای به‌طور یک‌نواخت و همگن با زاویه ۶۰ درجه به ستون اضافه شده و به سردخانه منتقل گردید. ستون به مدت یک شبانه روز به همان حالت باقی مانده ، تا بستر به صورت فشرده در آید. ۳ میلی لیتر از محلول آنزیمی تغلیظ شده که توسط کیسه دیالیز با cut off برابر ۱۲-۱۰ کیلودالتون به مدت ۱۲ ساعت در مقابل بافر استات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH برابر ۵/۵) دیالیز گردیده بود به آرامی و با دقت روی ستون بار شد. سپس خروجی ستون باز شده تا نمونه وارد بستر شود. ورودی و خروجی ستون را به دستگاه سیرکولاتور متصل، خروجی ستون را باز کرده تا کلیه پروتئین‌های موجود در بستر با چرخش درون ستون، فرصت اتصال به بستر را پیدا کنند.

پس از ۱۲ ساعت، ستون را با ۲۰۰ میلی لیتر بافر متعادل کننده به‌صورت یک مرحله‌ای با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه شستشو داده و زمان کافی را در نظر گرفته تا شستشوی پروتئین‌هایی که در لابه‌لای بستر مانده و متصل نشده‌اند نیز انجام گیرد. محلول خروجی ستون، مربوط به شستشو در نمونه‌های ۲/۵ میلی لیتری توسط دستگاه نمونه گیر (Fraction collector) جمع آوری و مقدار جذب نوری پروتئین‌های متصل نشده در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. بعد از این‌که مقدار جذب نوری پروتئین‌های متصل نشده به ستون در نمونه‌های جمع آوری شده به صفر رسید، برای جداسازی پروتئین‌های متصل شده به گروه‌های عمل کننده بستر، از دستگاه گرادیان ساز استفاده شد که در ظرف اول آن ۱۰۰ میلی لیتر بافر شستشو دهنده و در ظرف دوم ۱۰۰ میلی لیتر بافر جدا کننده (1M NaCl) ریخته شد و به‌کمک همزن مغناطیسی (با ایجاد گرادیان خطی بافر جدا کننده (۱ M NaCl-۰) پروتئین‌های متصل شده به ستون جدا شدند. سرعت جریان بافر ۱ میلی لیتر در دقیقه و حجم نمونه‌های جمع آوری شده به‌میزان ۲/۵ میلی لیتر تنظیم گردید. سپس نمونه‌های حاوی بیشترین فعالیت آنزیمی جمع آوری و مخلوط شده و پس از افزودن حجم برابر از استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد)، به‌وسیله سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ rpm رسوب داده شدند.

بررسی الگوی پروتئینی

جهت بررسی پروتئین‌های ترشحی و رسوب‌دهی آنها از دو روش استفاده گردید: استفاده از استن و نمک‌های معدنی. در

www.SID.ir

Archive of SID

روش رسوب‌دهی با استفاده از استن، محلول حاوی پروتئین ترشحی با حجمی برابر از استن سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) به آرامی مخلوط گردید و حدود ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مخلوط فوق با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm و بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله در کمترین حجم آب مقطر دو بار تقطیر، حل شده و در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در روش رسوب دهی با نمک‌های معدنی از سولفات آمونیوم ۷۰٪ استفاده گردید. در این روش مقدار ۷۰ گرم سولفات آمونیوم در ۱۰۰ میلی لیتر محلول حاوی پروتئین ترشحی به آرامی حل گردید. محلول اشباع حاصل حدود ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آنگاه پس از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰rpm، رسوب به دست آمده در یک میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر کاملاً حل شده و پس از انتقال به لوله های اپندورف، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین از روش (۴) Bradford استفاده شد که در آن از پروتئین (BSA) Bovine Serum Albomin به عنوان استاندارد استفاده گردید.

برای مشخص کردن خلوص پروتئین از SDS-PAGE استفاده گردید (۲۸). الکتروفورز در سیستم ناپیوسته (Stacking) (برابر ۵٪ و Resolving برابر ۱۲٪ انجام شد. رنگ آمیزی ژل‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی نقره (Silver staining) انجام گردید (۲۸).

برای تخمین وزن ملکولی، از مارکرهای وزن ملکولی استاندارد ساخت شرکت Pharmacia و برنامه نرم افزاری *UVIDoc* استفاده گردید.

تعیین pH مناسب برای اتصال پروتئین به بستر و فعالیت آنزیمی

به منظور تعیین pH مناسب برای اتصال پروتئین‌های موجود در محیط کشت به ستون، دامنه pH از ۴ تا ۸/۵ با فواصل ۰/۵ در نظر گرفته شد. به هر لوله یک میلی لیتر از بستر مورد نظر همراه با ۱۰ میلی لیتر بافراستات پتاسیم (۵۰ میلی مولار) با هر یک از pH های مورد مطالعه اضافه گردید. برای به تعادل رساندن بستر، بافر مذکور ۵ بار تعویض گردید. سپس به هر لوله مقادیر مساوی از محلول پروتئینی مورد مطالعه اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. مقدار جذب محلول رویی در ۲۸۰ نانومتر و نیز فعالیت آنزیمی آنها اندازه گیری شد.

پس از خالص سازی آنزیم به منظور مطالعه مناسب‌ترین pH برای فعالیت آنزیم، محلول‌های Substrate stock solution با pH های ۲/۵ تا ۸ با فواصل ۰/۵ تهیه گردید. فعالیت آنزیمی در هر pH مورد بررسی قرار گرفت.

Test plate

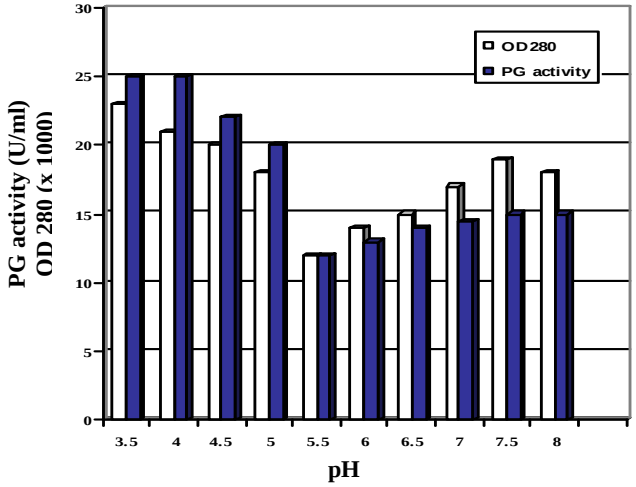
به منظور تشخیص وجود فعالیت آنزیم‌های پکتینی از روش Test Plate استفاده گردید. برای تشخیص فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به ۵ میلی‌لیتر از محلول A (بافر یک مولار استات پتاسیم با pH برابر ۴/۵)، ۵ میلی‌لیتر از محلول B (EDTA ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸) و۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. ۵۰ میلی‌گرم پلی‌گالاکتورونیک‌اسید و ۰/۵ گرم آگارز به آن افزوده شد. سپس محلول جوشانده شده و پس از حل شدن کامل مواد، بین پلیت‌ها تقسیم گردید. مقدار ۵ µl از هر نمونه روی پلیت نقطه‌گذاری و به مدت یک و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. سپس پلیت‌ها ۱۵ دقیقه با رنگ اختصاصی (Ruthenium red) (۰/۰۵ درصد) رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو، نمونه‌های دارای فعالیت آنزیمی به صورت لکه‌هایی روشن بر روی پلیت مشاهده می‌شدند.

Activity staining

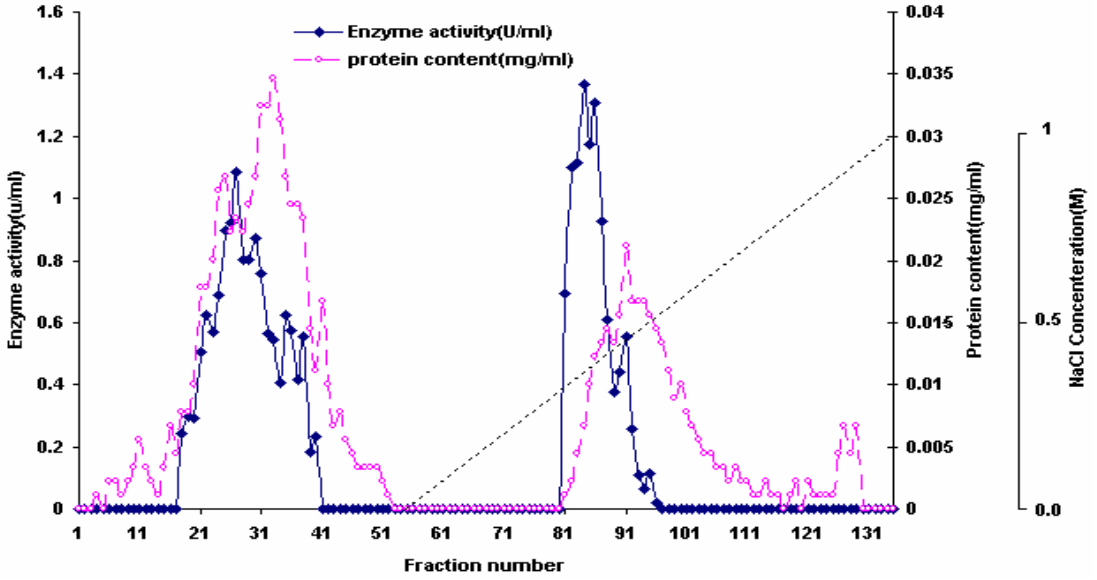
جهت بازیابی فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در فراکسیون‌های جمع آوری شده از نمونه های حاصل از کروماتوگرافی ، از تکنیک Zymogram به روش زمانی و همکاران (۳۷) استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. میزان فعالیت آنزیمی و مقدار پروتئین (OD_{280}) محلول روی بستر مورد استفاده در ستون کروماتوگرافی تعویض یونی در pH های مختلف. کمترین میزان جذب به بستر در pH برابر ۵/۵ مشاهده می‌شود.



شکل ۲. مقدار پروتئین و میزان فعالیت آنزیمی فراکسیون‌های مختلف جمع آوری شده از ستون کروماتوگرافی CM- Sepharose

نتایج

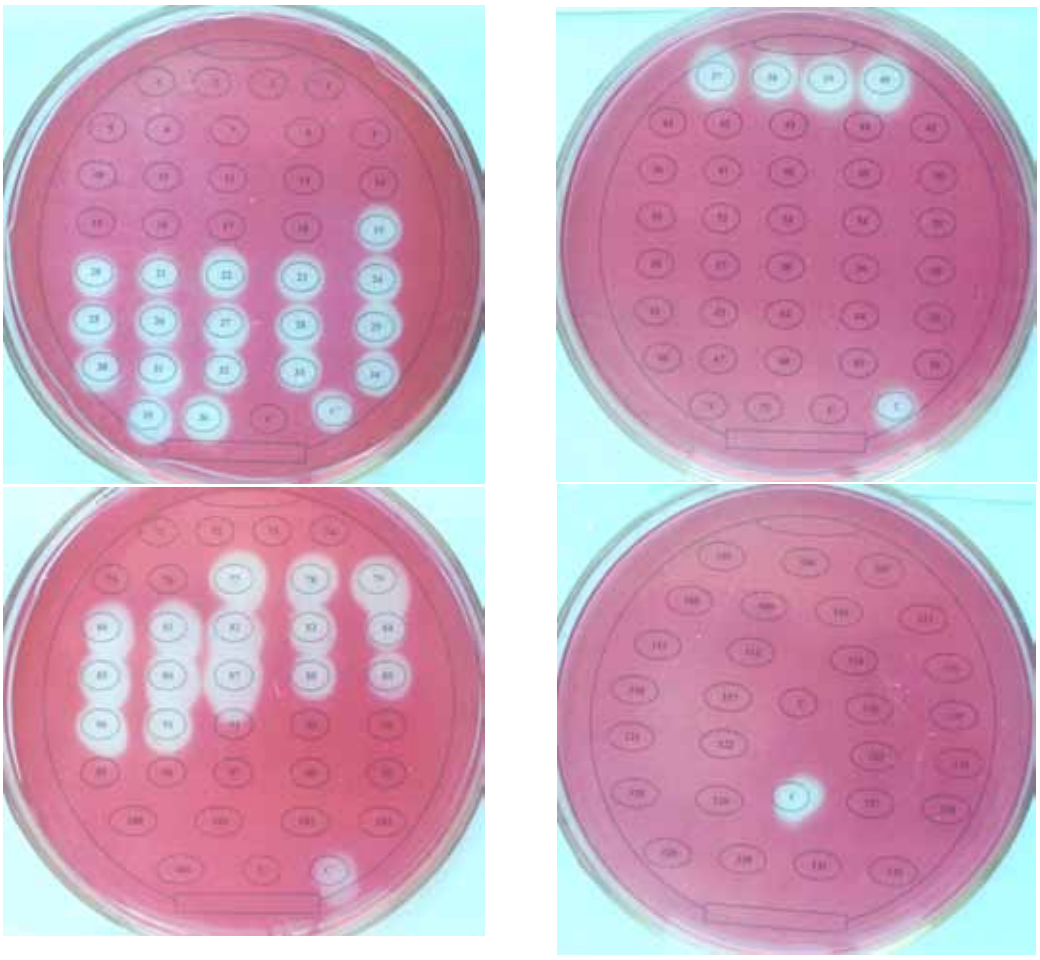
با توجه به این‌که اولین واکنش ملکولی بین پاتوژن از جمله قارچ *A. rabiei* و میزبان گیاهی، اثر آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی از جمله آنزیم پلی گالاکتوروناز روی سلول‌های میزبان می‌باشد، بنابراین جهت دستیابی به فرم خالص این آنزیم برای بررسی و مطالعه خصوصیات ملکولی آن، در این تحقیق اقدام به خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. rabiei* عامل ایجاد برق زدگی نخود گردید.

از آنجا که قبل از انجام خالص سازی لازم است شرایط مناسب برای اتصال آنزیم به بستر ستون مورد استفاده، مورد مطالعه قرار گیرد، در این تحقیق ابتدا تأثیر pH های مختلف بین ۳/۵ تا ۸ با فاصله های ۰/۵ در اتصال آنزیم به بستر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی میزان آنزیم پلی گالاکتوروناز متصل نشده به ستون نشان داد که مناسب‌ترین pH جهت انجام خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی تعویض یونی ۵/۵ می‌باشد (شکل ۱).

آنزیم پلی گالاکتوروناز به‌دست آمده از جدایه IK06 که در

www.SID.ir

Archive of SID



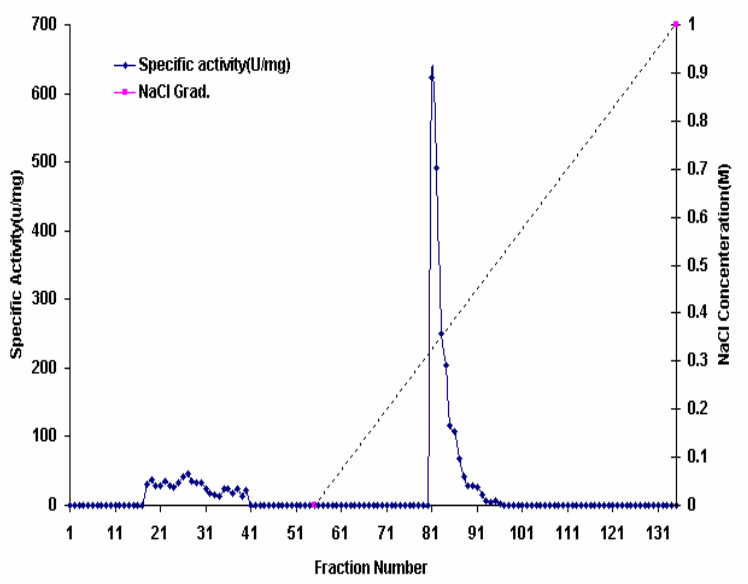
شکل ۳. بررسی فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز به روش test plate :
شماره‌های ۱ الی ۱۳۲ شماره فراکسیون‌های جمع آوری شده از ستون می‌باشد. فراکسیون‌هایی که دارای فعالیت آنزیمی بودند توسط هاله‌های شفاف مشخص می‌باشند. C= نمونه قبل از خالص سازی (شاهد).

محیط مایع PZ کشت داده شده بود پس از رسوب دهی با سولفات آمونیوم و انجام دیالیز جهت خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ستون با استفاده از بافر استات پتاسیم به تعادل رسید. سپس مقدار ۳ میلی لیتر از محلول نمونه پروتئینی به ستون اضافه گردید. در این مرحله ستون با بافر اولیه تا هنگامی شستشو داده شد که تمام پروتئین‌هایی که به ستون متصل نشده بودند از ستون خارج شدند. در مرحله شستشو تعداد ۵۵ فراکسیون ۲/۵ میلی لیتری جمع آوری گردید. اندازه‌گیری مقدار پروتئین این فراکسیون‌ها نشان داد که فراکسیون‌های شماره ۴ تا ۵۵ حاوی پروتئین بوده در حالی‌که فعالیت آنزیمی فقط در فراکسیون‌های ۱۸ تا ۴۰ مشاهده می‌گردد (شکل ۲). جهت تشخیص حضور آنزیم پلی گالاکتوروناز در فراکسیون‌های مختلف از روش تست پلیت استفاده شد (شکل ۳).

برای جدا کردن پروتئین‌های متصل شده به ستون از فراکسیون ۵۶ به بعد، از شیب غلظت نمکی صفر تا یک مولار NaCl استفاده گردید. اندازه‌گیری مقدار پروتئین، فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیمی هر یک از فراکسیون‌های شماره ۵۶ تا ۱۳۵

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. میزان فعالیت ویژه آنزیمی فراکسیون‌های مختلف جمع آوری شده از ستون کروماتوگرافی

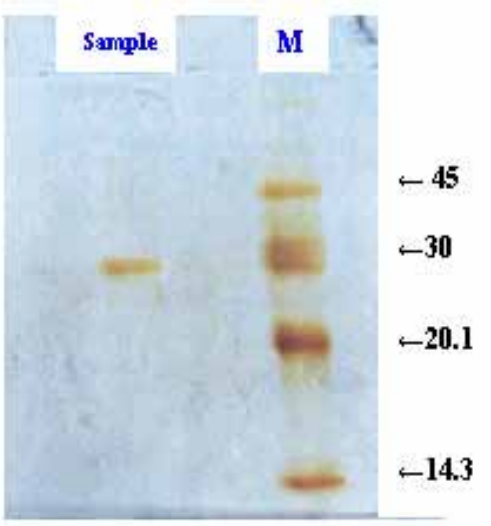
نشان داد که فراکسیون‌های ۸۱ تا ۱۳۰ حاوی مقادیر مختلف پروتئینی بوده در حالی‌که فقط فراکسیون‌های شماره ۸۱ تا ۹۶ فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز از خود نشان می‌دادند (شکل ۲). این فراکسیون‌ها (۸۱ تا ۹۶) در ناحیه غلظت نمکی بین ۰/۳ تا ۰/۴ میلی مولار از ستون خارج شده‌اند. بررسی فعالیت ویژه آنزیمی فراکسیون‌های مختلف نشان داد که فراکسیون‌های ۱۸ تا ۴۱ (مرحله شستشو) دارای فعالیت ویژه‌ای برابر U/mg ۴۶/۰–۱۲/۵ بوده و فراکسیون‌های ۸۱ تا ۸۸ (مرحله اعمال شیب نمکی) دارای فعالیت ویژه‌ای برابر U/mg ۶۲۲/۵–۴۲/۰ می‌باشند. فراکسیون‌های ۸۹ تا ۹۶ دارای فعالیت ویژه آنزیمی قابل ملاحظه‌ای نبودند (شکل ۴).

برای مشاهده میزان خلوص آنزیم از SDS-PAGE استفاده گردید. به این منظور فراکسیون‌های شماره ۸۱ تا ۸۸ که دارای بیشترین مقدار فعالیت ویژه آنزیمی بودند با یکدیگر مخلوط و پروتئین‌های موجود در نمونه های مخلوط شده پس از رسوب‌دهی با استون سرد مورد مطالعه قرار گرفتند. الگوی پروتئینی به‌دست آمده نشان داد که یک باند پروتئینی با وزن ملکولی حدود ۲۷ کیلودالتون خالص شده است (شکل ۵).

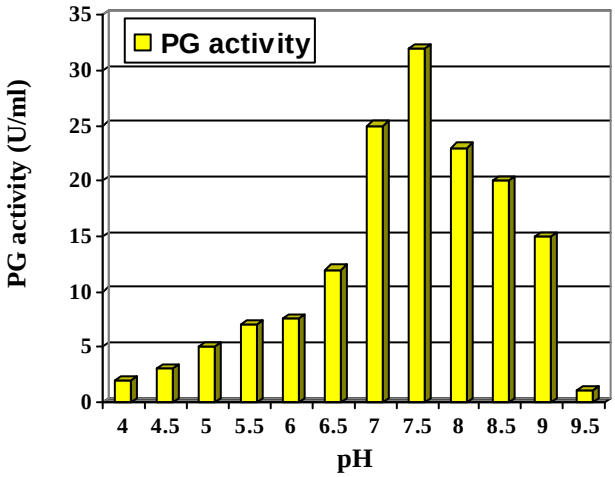
با توجه به این‌که pH مناسب جهت فعالیت آنزیم‌های پلی گالاکتورونازی مختلف دارای دامنه تغییرات زیادی می‌باشد، در این تحقیق برای به‌دست آوردن pH مطلوب جهت فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص‌سازی شده، از سوبسترا‌هایی با pHهای بین ۴ تا ۹/۵ با فاصله‌های ۰/۵ استفاده گردید. مقایسه میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در pHهای مورد مطالعه نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیمی در pH= ۷/۵ می‌باشد (شکل ۶). از آنجا که لازم است فعالیت آنزیمی پلی گالاکتوروناز پس از خالص‌سازی مورد بررسی قرار گیرد، در این مرحله با استفاده از روش Activity staining فعالیت آنزیمی آن مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه پروتئینی بعد از خالص سازی در ژل حاوی سوبسترا الکتروفورز شد. وجود تنها یک باند با فعالیت آنزیم پلی گالاکتورونازی نشان می‌دهد که پروتئین خالص شده در این تحقیق آنزیم پلی گالاکتوروناز می‌باشد (شکل ۷).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. باند پروتئینی خالص شده آنزیم پلی گالاکتوروناز (فراکسیون‌های ۸۸-۸۱)
از جدایه IK06 قارچ *A. rabiei* . M= مارکر پروتئینی، sample= نمونه خالص سازی شده



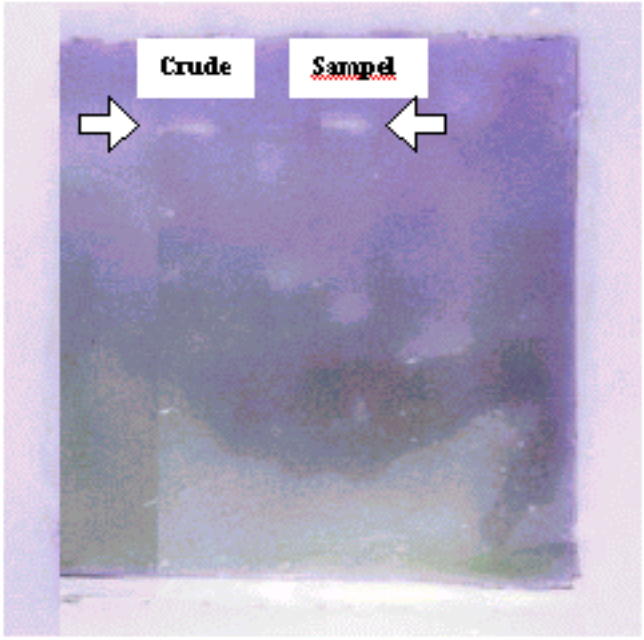
شکل ۶. میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص شده در pH های مختلف

بحث

توانایی پاتوژن‌های گیاهی برای تولید آنزیم‌های تجزیه کننده پلی ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاهان احتمالاً اولین مرحله در فرایند بیماری‌زایی می‌باشد (۲۵، ۲۷ و ۳۰). گزارش‌های موجود نشان می‌دهند که آنزیم‌های تجزیه کننده پکتین دیواره سلولی گیاهان از جمله آنزیم پلی گالاکتوروناز معمولا ترشحی می‌باشند(۱۲ و ۱۴). جرم ملکولی فرم‌های مختلف آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌ها و باکتری‌ها در دامنه گسترده‌ای قرار می‌گیرد. لئون و همکاران (۱۷) PG با جرم ملکولی ۲۳ کیلو دالتون را از قارچ *Botrytis cinerea* خالص سازی نموده‌اند. پولیزل و همکاران (۲۵) جرم ملکولی آنزیم PG خالص شده از قارچ *Neurospora crassa* را ۳۷ کیلودالتون گزارش نمودند. هم چنین پلی گالاکتوروناز‌هایی با وزن ملکولی ۳۴ و ۳۷ کیلودالتون از قارچ *Rhizoctonia solani* (۲۰) ، ۳۶ کیلودالتون از قارچ *Rhizoctonia fragariae* (۶)، ۳۸ و ۴۰ کیلودالتون از *Fusarium oxysporum* (۲)، ۴۲ کیلودالتون

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷. فعالیت آنزیمی (zymogram) مربوط به پروتئین خالص سازی شده (Sample) و نمونه اولیه(Crude).

از قارچ‌های *Sclerotinia sclerotiorum* (۲۱) و *Saccharomyces cervisiae* (۱۳)، ۶۶ و ۷۰ کیلودالتون از *Botrytis cinerea* (۲۶) و ۱۱۵ کیلودالتون از جنس Bacillus (۱۶) گزارش شده است. آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز از اولین آنزیم‌هایی هستند که در مراحل اولیه ایجاد بیماری توسط بسیاری از قارچ‌ها از جمله قارچ *Ascochyta rabiei* ترشح می‌شوند (۲۴ و ۳۲).

خالص‌سازی و تعیین خصوصیات آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز می‌تواند جهت بررسی دقیق‌تر عملکرد آنها در شرایط *in vitro* و یافتن پروتئین مهارکننده آنها (Polygalcturonase inhibiting protein, PGIP) در گیاهان مقاوم به عامل بیماری، مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به تنوع آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز در قارچ‌های مختلف، در این تحقیق از جدایه بیماریزای (IK06) قارچ *A. rabiei* که از مزارع نخود آلوده در استان کرمانشاه جمع آوری گردیده بود (۳۶) اقدام به خالص سازی این آنزیم گردید.

برای خالص‌سازی آنزیم PG از میکروارگانیسم‌های مختلف هر دو نوع ستون تعویض کننده کاتیونی (۱۸) و آنیونی (۱۳) به کار رفته است. در این تحقیق جهت خالص‌سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی Carboxy Methyl Sepharose استفاده گردید که این آنزیم به صورت یک قله مشخص استخراج و وزن ملکولی آن به کمک SDS-PAGE حدود ۲۷ کیلو دالتون تعیین گردید.

برای بررسی فعالیت آنزیمی باند پروتئینی خالص شده ابتدا با خارج کردن SDS از داخل ژل، به renature کردن پروتئین اقدام گردید لیکن پروتئین مذکور فعال نشده و فعالیت آنزیمی از خود بروز نداد. در ادامه از تکنیک زایموگرام جهت بازیابی فعالیت آنزیم استفاده شد. وجود یک باند با فعالیت پلی گالاکتوروناز در ژل مورد تایید قرار گرفت که نشان دهنده وجود تنها یک فرم از آنزیم در پروتئین خالص شده می‌باشد.

گزارش‌ها نشان می‌دهند که pH مناسب برای فعالیت آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز به دست آمده از قارچ‌ها و باکتری‌ها دارای دامنه نسبتاً وسیعی می‌باشد. برخی از این آنزیم‌ها در دامنه وسیعی از pH های اسیدی (۷ و ۱۳) فعالیت دارند در حالی که بعضی دیگر در pH های در حدود ۸ تا ۱۲ فعالیت می‌نمایند (۱۵ و ۱۶). در این تحقیق pH مناسب برای فعالیت

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص شده از جدایه مورد مطالعه برابر ۷/۵ تعیین گردید. بنابراین آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. rabiei* را می‌توان توسط روش مورد استفاده در این تحقیق به خوبی خالص نمود تا در مرحله مطالعه اثر متقابل این آنزیم با PGIP مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

۱. اخوت، م. ۱۳۷۵. مطالعه در مورد چند روش مبارزه علیه قارچ *Ascochyta rabiei* عامل برق زدگی نخود. مجله علوم کشاورزی ایران ۴: ۱۲-۱.

2. Alani B., M. Motallebi and M.R. Zamani. 2004. Purification and partial characterization of polygalacturonase from highly virulent (HV) isolate of *Fusarium oxysporum* (F23). Iranian J. Biol. 16(4) : 1-11.
3. Bateman, D. F. and H. G. Bashman. 1976. Degradation of Plant Cell Walls and Membranes by Microbial Enzyme. PP. 316-355, *In:* R. Heiteffus and P. H. Williams (Eds.), Encyclopedia of Plant Physiolgy New Series, Pysiological Plant Pathology, Springer verlag, Berlin.
4. 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 Biochem. 72: 248-254.
5. Butler E.J. 1918. Fungi and Diseases in Plants. Thaker, Sprink and Co., Calcutta, India.
6. Cervone, F., R. castoria, F. Lechie, G. De Lorenzo 1997. Perception of fungal elicitors and signal transduction. PP. 153-177. *In:* P.Aducci (Ed.), Signal Transduction in Plants. Birkauser Verlag, Basel, Switzerland,
7. Clausen, C. A. and F.Green 1996. Characterization of polygalacturonase from the brown-rot fungus *postia placenta*. Appl. Microbiol. Biotech. 45: 750-754.
8. Collmer, A., J. L. Ried and M. S. Mount. 1988. Assay method for pectic enzymes. Method in Enzymol. 161: 329 - 335.
9. Cooper , R. M. 1984. The Role of cell Wall-degredation Enzyme in Infection and Damage and Loss. Black-Well scientific Pub., Londen.
10. Cooper, R. M. 1983. The mechanisms and significance of enzyme degradation of host cell walls by parasites. Biochemical Plant Pathology, Wiley & Sons, Chichester, England.
11. Doneche, B. and C. Cabanne. 2002. Purification and characterization of two izozymes of polygalacturonase from B*otrytis cinerea*. Effects of calcium ions on polygalacturonase activity. Mycrobiol. Res. 157: 1-7.
12. Gacto, M., J.V. Solar and C. Pardo. 1992. Production and characterization of pectic enzyme from Yeasts. *In*: Profiles on Biotechnology. Sevicio de Pub., Universidade de Santiago, Spain.
13. Gainvors, N., S. Nedjaoum and M. Muzart 2000. Purification and characterization of acidic endopolygalacturonases encoded by the PGL1-1 gene from *Saccharomyces cervisiae*. FEMS Microbiol. Letters 183(1): 131-135.
14. Jones, T. M., A. J. Anderson and P. Albersheim1972. Host pathogen interactions.Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Physiol. Plant Pathol. 2: 153-166.
15. Kapoor, M., Q. Khalil Beg and B. Bhushan. 2000. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus*. Process Biochem. 36 (5): 467-473.
16. Kobayashi, T., N. Higaki, A.Suzumatsu and K. Sawada. 2001. Purification and properties of a high- molecular-wight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. Enzyme and Microbial Technol. 29 (1) *:* 70-75.
17. Leone., G., E. A. M. Schoffelmeer and J. V. D. Heuvel. 1990. Purification and characterization of a constitutive polygalacturonase associated with the infection process of French bean leaves by *Botrytis cinerea*. Can. J. Botany 68: 1921-1928.
18. Maceria, G., P. Pietro and I. Roncero. 1997. Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*. FEMS Microbiol. Letters 154: (1) 37-43.
19. Maden, S., D. Mathur and Neergaard, S. B. 1975. Detection and Location of Seed Born Inoulum of *Ascochyta rabiei* and its transmission in Chick-pea (*Cicer arietinum* L.). Seed Sci. and Technol. 3: 667-681.
20. Marqus., L., I. Barash. B. Sneh, Y. Koltin and A. Finkler. 1986. Purification and Characterization of a pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani*. Physiological and Molecular Plant Pathol. 29: 325-336.
21. Martel, M., R. Letoublon and M. Fevre. 1998. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the sparophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiol. Letters 158(1): 133-138.

www.SID.ir

Archive of SID

22. Martinez, M. J., M. T. Alconada F. Guillen C.Vazquez and F. Reyes. 1991. Pectic activites from *Fusarium oxysporunm f.sp Melonis* : Purification and Characterization of an exopolygalacturonase. FEMS Microbiol. Letters 81: 145-150.
23. Mmbaga, M.T. 1997. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* and Ascochyta blight resistance in chickpea, PP. 23-37, *In:* DNA markers and breeding for resistance to Ascochyta blight in chikpea, proceeding of the symposium on application of DNA fingerprinting for crop improvement, 11-12 April, Aleppo, ICARDA, Syria.
24. Nene, Y. L. and M. V. Reddy. 1987. Chickpea diseases and their control. PP. 233-270. *In:* M. C. Chickpea, K. B. Saxena and Singh (Eds.), CAB International Oxon, UK.
25. Polizeli, M., J. Jorge and H. Terenzi. 1991. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. J. Gen. Microbiol. 137: 1815-1823.
26. Rha, E., H. Park, M. Kim, and Y. Chung, 2001. Expression of exopolygalacturonase in *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol. Letters 201(1): 105-109.
27. Roncero, G., M. Isabel and A. D. Pietro. 1997. Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. FEMS Microbiology Letters 154: 37-43.
28. Sambrook, J., D.W. Russell. 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, NewYork, NY.
29. Sanwal, G. G. and N. Pathek. 1998. Multiple forms of polygalacturonase from banana fruits. Phytochem. 48: 249-255.
30. Sathish, K. S. and P. Palanivelu. 1999. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, Thermomyces lanuginosus. World J. Microbiol.& Biotechnol. 15: 643-646.
31. Singh, K.B. 1997. Experience with pyramiding of *Ascochyta rabiei* resistance genes in Kabuli in chickpea. *In:* "DNA markers and breeding for resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpea" (S.M. Udupa and F. Weigand, eds). ICARDA, Aleppo, Syria.
32. Thenhaken, R. and W. Barz. 1991. Characterization of Pectic Enzymes from the Cihkpea Pathogen *Ascochyta rabiei*. Z. Naturforsch. 46c: 51-57.
33. Wakabayashi, K. and D. Huber. 2001. Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. Physiologia-Plantarum 113: 210-216.
34. Younessi, H., M. Okhovat and M.R. Zamani. 1998. Study of chickpea blight in Kermanshah province. The 13th Iranain Plant Protection Congress. 23-27 August, Karaj, Iran.
35. Zalpoor, N. 1963. *Ascochyta rabiei* Lab. (*Mycospharella rabiei*, Kovachevski) Ent. Phytopathol. Appl. 21: 10-12.
36. Zamani, M.R., M. Motallebi and A. Hosseinzadeh Colagar. 1998. Virulence and polymorphic DNA relationships of *Ascochyta rabiei* to geographical regions. Iranian J. Biol. 7:1-17.
37. Zamani, M.R., M. Motallebi and M.J. Harighi. 2001. Pectic enzyme paterns of *Fusarium oxysporum* isolates from chickpea in Iran. J. Sci. Islamic Republic of Iran 12 (1): 17-21.

www.SID.ir