پژوهش و سازندگی
در زراعت و باغبانی
شماره ۶۳، تابستان ۱۳۸۳

مطالعه آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Fusarium oxysporum* (F۵۸) عامل بیماری بوته زردی نخود

• **بهرنگ علنی**، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی
• **محمدرضا زمانی**، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
• **مصطفی مطلبی**، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۸۳

چکیده

در ایـن تحقیـق از تکنیک کروماتوگرافی تبـادل یونی از نوع کاتیونی (CM-Sepharose Fast Flow) جهت خالص سـازی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز از جدایه F۵۸ (جدایه با شدت بیماریزای کم) که از قارچ *Fusarium oxysporum* عامل بوته زردی نخود جدا شده بود، استفاده گردید. نتایج حاصل از اعمال شیب نمک NaCl یک مولار . نشان داد که در ناحیه غلظت نمکی بین ۰/۵ – ۰/۳ مولار، یک قله فعالیت آنزیمی وجود دارد. نتایج بدسـت آمده از الگوی پروتئینی، وجود دو باند با وزنهای مولکولی حدود ۳۳ و ۳۵ کیلو دالتـون در جدایـه F۵۸ را نشـان داد. مطالعه رنگ آمیزی فعالیت آنزیم (Enzyme activity staining)، دو باند مشـخص مربوط به آنزیمهای خالص شـده را نشـان داد که دلالت بر ایزوآنزیمهای این آنزیم دارد. ضمنا مناسب ترین pH برای فعالیت آنزیم مورد مطالعه، قبل و بعد از خالص سازی برابر ۴/۵ بدست آمد.

کلمات کلیدی: نخود، پلی گالاکتوروناز، فوزاریوم، کروماتوگرافی، پکتین

Pajeuhesh & Sazandegi No: 63 pp: 96-103

Study of polygalacturonase of Fusarium oxysporum (F58), causal agent of chickpea yellows

By: Alani B., Biology Dept., Faculty of Science, Rozi university, Kermanshah, Iran.
M.R. Zamani and M.Motallebi, Natianul Research Center for Genetic Engineering Biotechnology (NRCGEB), Tehran, Iran.

Fusarium wilt disease is one of the most effective factors of Chick-pea (*Cicer arietinum*) crop losses in the West and North-west of Iran which is caused by *Fusarium oxysporum*. Many phytopathogenic microorganisms,

Archive of SID
Pajouhesh & Sazandegi
www.SID.ir

incuding *Fusarium oxysporum*, attack their host plant by secreting pectic enzymes which causes modification of cell-wall structure, increasing accessibility of cell-wall components for degradation by other enzymes. To study polygalacturonase enzymes from isolate F58 of *Fusarium oxysporum*, enzyme purification was achieved by cation exchange chromatography. Elution of the column was carried out with 1M NaCl gradient. The presence of PG enzymes was investigated by SDS-PAGE. The results showed two distinct bands , about 33 and 35 kDa in isolate F58. These two bands showed PG activity in enzyme activity staining technique. The optimum pH for enzyme activity before and after purification was determined to be about 4.5.

Key words: Chickpea, Polygalacturonase, *Fusarium oxysporum*, Chromatography, Pectin.

مقدمه

بیماریهای گیاهی یکی از مشکلات مهمی است که امروزه کشاورزی کشور با آن مواجه بوده و هر ساله خسارات زیادی در اثر این بیماریها به کشاورزان وارد می‌شود. قارچها یکی از عوامل مهم در ایجاد بیماریهای گیاهی محسوب می‌گردند. بیماری بوته زردی در نخود (*Cicer arietinum*. L) برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۲ از مزارع کرج، مرند، خوی، اهر و قزوین گزارش گردیده است(۲). در ایران در سال ۱۳۴۵ عامل اصلی این بیماری *Fusarium oxysporum* گزارش شده است (۳). گزارشات موجود در چند استان کشور از جمله استان کرمانشاه نشان می‌دهد که عوامل اصلی ایجاد این بیماری قارچهای *Fusarium oxysporum* Schtecht و *Fusarium solani* Kuhn می‌باشند (۱). خسارت‌ها به اشکال مختلفی توسط این عامل بیماری زا در نخود ایجاد می شود. از جمله می‌توان به زرد شدن وریختن برگ‌های گیاه آلوده ، ضعیف شدن بوته و تاثیر گذاشتن در فتوسنتز که باعث کوچک ماندن و تقلیل تعداد دانه می شود اشاره نمود. موارد مذکور در نهایت موجب کاهش محصول می‌گردند (۲).

با توجه به اینکه پاتوژنهای گیاهی طیف وسیعی از آنزیمهای خارج سلولی را ترشح می‌کنند می‌توانند دیواره سلولی گیاهی که غنی از مواد پکتینی است را تجزیه کنند لذا نقش آنزیمهای تجزیه کننده دیواره سلولی در برقراری بیماری و توسعه آن مورد مطالعه و تحقیقات بسیاری قرار گرفته است (۲۵). تولید آنزیمهای تخریب کننده پلی ساکاریدهای دیواره سلولی گیاهان توسط پاتوژنهای گیاهی به‌عنوان اولین مرحله در روند بیماریزایی جهت نفوذ به داخل میزبان و تکثیر در آنها محسوب میگردد. آنزیمهای تجزیه کننده پکتین دارای وزن ملکولی پایین و پایدار بوده و معمولا به‌صورت ایزوآنزیمهای مختلفی تولید می‌شوند که از نظر اندازه, بارالکتریکی, پایداری و توانایی برای تخریب دیواره های سلولی متفاوت هستند. این آنزیمها پیوند آلفا ۴-۱ بین واحدهای سازنده پکتین را شکسته و سبب تجزیه (maceration) تدریجی و مرگ بافت گیاهی میگردد. همچنین این آنزیمها باعث تخریب شدید دیواره اولیه سلول در انواعی از بیماری‌ها همانند مرگ گیاهچه (damping-off)، پوسیدگی نرم و خشک ریشه‌ها، ضایعات برگ و ساقه و افزایش حساسیت دیواره‌های سلولی در مقابل حملهٔ دیگر پاتوژن‌های گیاهی می گردند (۶، ۲۳) .

بیش از ۲۰ نوع آنزیم تجزیه کننده دیواره سلولی شناخته شده که به‌وسیله پاتوژنهای مختلف تولید می‌گردند. آنزیم پلی گالاکتوروناز به‌عنوان یکی از مهمترین آنزیمهای تجزیه کننده دیواره سلولی گیاهان گزارش شده اند(۲۲). پلی گالاکتوروناز‌ها در بافت‌های آلوده شده و شرایط آزمایشگاهی در pH اسیدی و دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه حداکثر فعالیت را نشان می دهند. با این وجودآنزیم‌هایی از این دسته در باکتری Bacillus sp.MG-cp-۲ بدست آمده اند که در pH مطلوب ۱۰ و دمای بالای ۶۰ درجه سانتی گراد فعالیت بهینه را از خود نشان داده اند(۱۳) .pH ایزوالکتریک (pI) این آنزیم‌ها بین ۳ تا ۸ متغیر است. Roncero و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که pH بهینه برای فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز می تواند به نوع سوبسترا نیز بستگی داشته باشد (۲۰). به‌طوریکه یک آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص شده از قارچ *Fusarium oxysporum* fsp lycopersici در محیط حاوی پکتین، pH بهینه برابر ۵ ، و در محیط حاوی پلی گالاکتورونیک اسید، pH بهینه برابر۷ را ازخود نشان می دهد. جهت مطالعه خصوصیات آنزیم پلی گالاکتوروناز در پاتوژنهای مختلف گیاهی گزارشات متعددی در خصوص خالص سازی این آنزیم با استفاده از روشهای مختلف وجود دارد. به‌عنوان مثال آنزیم پلی گالاکتوروناز از قارچ *Fusarium oxysporum* جدا شده از نخود با استفاده از روشهایی مانند فیلتراسیون ژلی، کروماتوگرافی تبادل یونی و غیره خالص‌سازی گردیده است (۴، ۱۶، ۲۰). همچنین این آنزیم از قارچهای دیگری نظیر *Neurospora crassa* Aspergillus sp. , *Postia placenta*, *Termomyces lanuginosus*, *Saccharomyces cervicee* و *Botrytis cinerea* خالص سازی و مورد مطالعه قرار گرفته است(۷، ۱۰، ۱۲، ۱۹، ۲۱). با توجه به اهمیت نقش آنزیم پلی گالاکتوروناز در بیماریزایی قارچ *F. oxysporum* در گیاه نخود, در این تحقیق برای بدست آوردن آنزیم خالص جهت مطالعه خصوصیات ملکولی, از جدایه (F۵۸) با شدت بیماریزایی کم (Weakly virulent,WV) قارچ *F. oxysporum* که از گیاه نخود آلوده از استان آذربایجان شرقی بدست بود، استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روشها

جدایه قارچ

جدایه قارچ(F ۵۸) *Fusarium oxysporum* که در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت از استان آذربایجان شرقی (تبریز) از ریشه های آلوده نخود جمع آوری و خالص سازی گردیده است.

محیطهای کشت

برای نگهداری قارچ از محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) (۳۹ گرم در لیتر) استفاده گردید. برای فراهم نمودن شرایط مناسب جهت تولید آنزیمهای پکتینی توسط قارچ *F. oxysporum* از محیط کشت زایموگرم Pecic (Zymogram medium, PZ) به شرح زیر استفاده گردید (۲۷). 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 Collmer و همکاران (۸) همراه با تغییراتی، به شرح زیر اندازه گیری شد. ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی پلی گالاکتوروناز با ۲۱۰ میکرولیتر محلول ذخیره سوبسترا حاوی ۰/۳درصد (w/v) پلی گالاکتورونیک اسید در لوله اپندورف مخلوط شده و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. 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 به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. پس از سرد شدن ۵۰۰ میکرولیتر معرف آرسنومولیبدات [۵٪ (w/v) آمونیم مولیبدات، ۶/.٪ (w/v) دی سدیم هیدروژن آرسنات و ۴/۲٪ (v/v) اسید سولفوریک ۹۶٪] به مخلوط اضافه و سانتریفوژ شده (۱۲۰۰۰ xg) و میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. اندازه گیری فعالیت آنزیم برای هر جدایه در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش از دی- گالاکتورونیک اسید بعنوان استاندارد استفاده شد. در این شرایط یک واحد آنزیم در مدت ۲۰ دقیقه تشکیل یک میکرومول اولیگوگالاکتورونیک را می‌دهد.

کروماتو گرافی تعویض یونی بر روی بستر CM- Sepharose Fast Flow

یک ستون کروماتوگرافی به ابعاد ۲۵ × ۲ سانتی‌متر (ارتفاع × قطر) انتخاب گردید. مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از بستر CM-Sepharose Fast Flow که بصورت تجاری به فرم سوسپانسیون می باشد (از شرکت Pharmacia)، درون بشر ریخته و بر روی آن ۲۰۰ میلی لیتر بافر متعادل کننده (استات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH برابر۵/۵) اضافه و مخلوط گردید. پس از ۱۵ دقیقه ساکن گذاشتن مخلوط و ته نشین شدن بستر، بافر رویی تعویض می‌گردد. پس از چند بار تعویض بافر ، بستر به کمک یک میله شیشه ای به طور یکنواخت و همگن با زاویه ۶۰ درجه به درون ستون اضافه شده و به سردخانه منتقل گردید. ستون به مدت یک شبانه روز به همان حالت باقی مانده ، تا بستر به صورت فشرده درآید. جهت تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز ابتدا جدایه F۵۸ قارچ در محیط کشت مایع PZ در حالت Shaking به مدت ده روز کشت داده شدند. سپس رسوب دهی پروتئین‌ها با سولفات آمونیم انجام گرفت. پروتئین‌های حاصله دیالیز گردیده (cut off برابر ۱۲-۱۰ کیلو دالتون) و جهت ستون کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفتند. ۴ میلی لیتر از محلول آنزیمی غلیظ شده به آرامی و با دقت بر روی ستون بار شده و سپس خروجی ستون باز شد تا نمونه وارد بستر شود. سپس ورودی و خروجی ستون را به دستگاه سیرکولا تور متصل، خروجی ستون را باز کرده تا کلیه پروتئین‌های موجود در بستر با چرخش درون ستون, فرصت اتصال به بستر را پیدا کنند.

بعد از ۱۲ ساعت, ستون را با ۲۰۰ میلی لیتر بافر متعادل کننده به‌صورت یک مرحله ای با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه شستشو داده و زمان کافی رادر نظر گرفته تا شستشوی پروتئین‌هایی که در لابلای بستر مانده و متصل نشده ا ند نیز انجام گیرد. محلول خروجی ستون مربوط به شستشو در نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری تو سط دستگاه نمونه‌گیر (Fraction collector) جمع آوری و مقدار جذب نوری پروتئین‌های متصل نشده در ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری 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 شست‌وشو دهنده و در ظرف دوم ۱۰۰ میلی لیتر بافر جدا کننده (۱mm NaCl) ریخته شدو به کمک همزن مغناطیسی (با ایجاد گرادیان خطی بافر جدا کننده (mm NaCl) و۱-۰) پروتئین‌های متصل شده به ستون جدا شدند. سرعت جریان بافر ۱ میلی لیتر در دقیقه و حجم نمونه‌های جمع آوری شده بمیزان ۲ 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)، بوسیله سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰g رسوب داده شدند.

بررسی الگوی پروتئینی

جهت بررسی پروتئینهای ترشحی و رسوب دهی آنها از دو روش استفاده گردید: استفاده از استن و نمک‌های معدنی. در روش رسوب دهی 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 ۲۰درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس مخلوط فوق با سرعت ۱۴۰۰۰ g و بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله در کمترین حجم آب مقطردو بار تقطیر حل شده و در دمای ۲۰ 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 نیمه اشباع حاصل حدود ۱۲ ساعت در دمای (۲۰ درجه سانتیگراد) قرار داده شد. آنگاه پس از ۳۰ دقیقه سانتریفوژ با سرعت۱۴۰۰۰g، رسوب حاصله در یک میلی لیتر آب مقطر سه بار تقطیر کاملاً حل شد وپس از انتقال به لوله های اپندورف، در ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش Bradford (۵) استفاده شد

Archive of SID
www.SID.ir

که در آن از پروتئین BSA) Bovine serum albumin) به عنوان استاندارد استفاده گردید.

برای مشخص کردن خلوص پروتئین از SDS-PAGE به روش Laemlli, ۱۹۷۰ استفاده گردید (۱۴). الکتروفورز در سیستم ناپیوسته (۵٪ Stacking و ۱۲٪ Resolving) انجام شد.

برای تخمین وزن ملکولی ، از مارکرهای وزن ملکولی استاندارد ساخت شرکت Pharmacia (میوزین با ۲۱۲ کیلو دالتون، فسفوریلاز b با ۹۷ کیلو دالتون، فسفوریلاز b با ۶۶ کیلو دالتون، آوالبومین با ۴۵ کیلو دالتون، کربونیک انهیدراز با ۳۰ کیلو دالتون، مهار کننده تریپسین با ۲۰ کیلو دالتون و لیزوزیم با ۱۴/۳ کیلو دالتون) و برنامه نرم افزاری UVIDoc استفاده گردید.

تعیین pH مناسب برای اتصال پروتئین به بستر و فعالیت آنزیمی

جهت تعیین pH مناسب برای اتصال پروتئینهای موجود در محیط کشت به ستون دامنه pH از ۴ تا ۸/۵ با فاصله 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 pHهای 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 بالایی در ۲۸۰ نانومتر و نیز فعالیت آنزیمی آنها اندازه‌گیری شد.

پس از خالص سازی آنزیم به منظور مطالعه مناسب ترین pH برای فعالیت آنزیم، محلول‌های Substrate stock solution با pH های ۲/۵ تا ۸ با فاصله ۰/۵ تهیه گردید. فعالیت آنزیمی در هرpH مورد بررسی قرار گرفته و سپس با رسم منحنی pH در برابر فعالیت آنزیمی حدودpH مناسب تعیین گردید.

Test plate

جهت 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 EDTA ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸) و ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. ۰/۰۵ گرم 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 درجه‌سانتیگراد نگهداری گردید. سپس پلیتها ۱۵ دقیقه با رنگ اختصاصی Ruthenium red ۰۵/۰ درصد رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو، نمونه‌های دارای فعالیت آنزیمی به صورت لکه‌هایی روشن بر روی پلیت مشاهده می‌شدند.

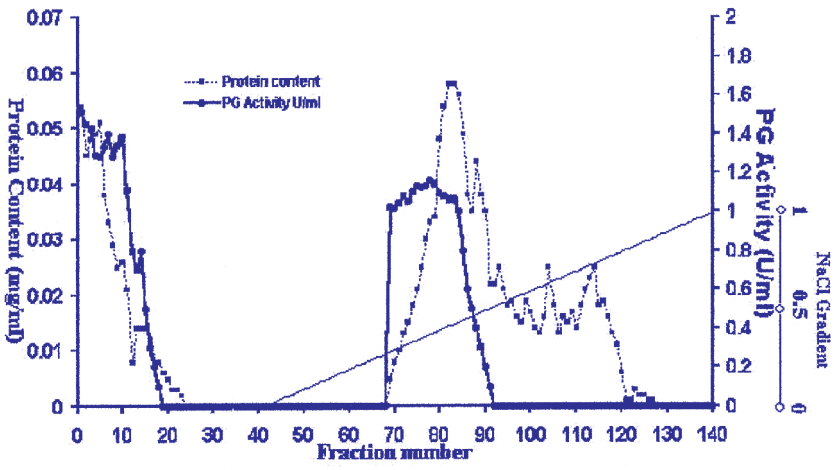
Zymogram

جهت بازیابی فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز بعد از الکتروفورز بر روی ژل پکتین اکریل آمید در فراکسیونهای جمع آوری شده از نمونه های حاصل از کروماتوگرافی ، از تکنیک Zymogram به روش زمانی و همکاران (۲۷) استفاده شد.

نتایج

از آنجا که آنزیم پلی گالاکتوروناز در بیماریزایی پاتوژنهای گیاهی از اهمیت خاصی برخوردار است (۴، ۶، ۲۳)، در این تحقیق آنزیم فوق الذکر خالص سازی و برخی از خصوصیات ملکولی آن مورد مطالعه قرار گرفت. جدایه F۵۸ از قارچ *Fusarium oxysporum* که از جدایه های با شدت بیماریزایی کم (۲۷) (WV) در گیاه نخود می‌باشد انتخاب شده و خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز آن با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد.

به منظور افزایش کارائی ستون مورد استفاده, شرایطی مورد بررسی قرار گرفت که در آن شرایط بیشترین پروتئین مورد نظر به صورت اختصاصی به ستون متصل شده و پروتئین ها ی دیگر تا حد امکان به بستر متصل نگردند. اتصال به بستر با واسطه بر هم کنش‌های الکترواستاتیک صورت می پذیرد که خود این بر هم کنش ها تابع pH و قدرت یونی محیط می باشند. بنابراین با تهیه بسترهای ستون تعویض یونی که pH آنها متفاوت است، مقادیر یکسانی از نمونه پروتئینی اولیه در این بستر ها وارد گردید. پس از سپری شدن مدت زمان لازم مقدار پروتئین و میزان فعالیت آنزیمی در محلول روی بستر برای این pH ها اندازه گیری شد. نتایج حاصله نشان میدهد که بهترین pH برای این ستون بین ۵/۵ تا ۶ می‌باشد. زیرا در این pH مقدار پروتئین آزاد و نیز فعالیت آنزیمی کاهش



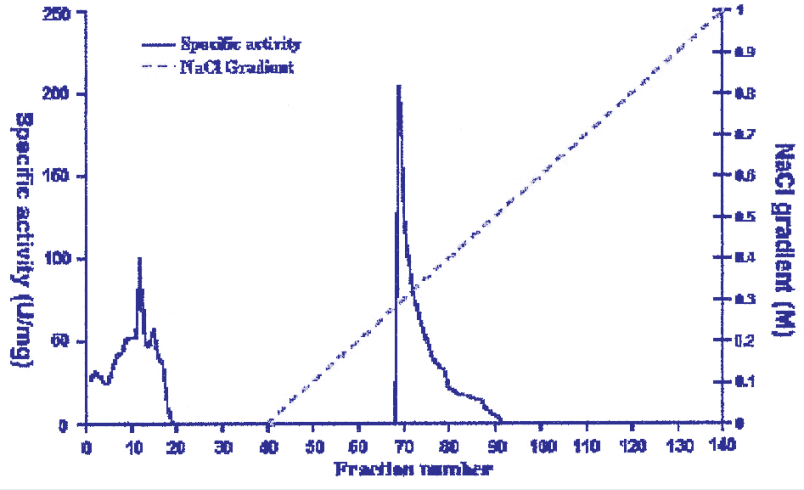
شکل ۱- نمودار مربوط به مقدار پروتئین و میزان فعالیت آنزیمی هر یک از اجزای ستون کروماتوگرافی در جدایه F58 قارچ *Fusarium oxysporum* محورهای عمودی از چپ به راست عبارتند از: مقدار پروتئین، میزان فعالیت آنزیم و غلظت نمک NaCl. محور افقی شماره اجزای متوالی را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

محسوسی را نشان می دهند. جذب پائین در ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده اتصال بیشتر پروتئین ها به ستون بوده ضمن اینکه فعالیت آنزیمی کم محلول روی بستر بیانگر اتصال اختصاصی آنزیم به بستر می‌باشد.

برای خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز، مقدار ۴ میلی لیتر محلول نمونه پروتئینی بر روی ستون نمونه گذاری گردید. به منظور جداسازی پروتئین‌های متصل نشده به بستر ستون با بافر اولیه شستشو داده شد تا میزان پروتئینهای خروجی برابر با صفر شود. چهل فراکسیون ۲ میلی لیتری در این مرحله جمع آوری گردید. بررسی فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز و اندازه گیری پروتئین این فراکسیونها نشان داد که فراکسیونهای شماره ۱ تا ۲۳ حاوی پروتئین بوده در حالیکه فقط فراکسیونهای ۱ تا ۱۸ دارای فعالیت آنزیمی می‌باشند. فراکسیونهای ۲۴ تا ۴۰ فاقد هر گونه پروتئین یا فعالیت آنزیمی می‌باشند (شکل ۱).

در این مرحله, از شیب غلظت صفر تا یک میلی مولار NaCl برای جدا کردن پروتئین‌های متصل شده به ستون استفاده گردید. جهت تشخیص حضور آنزیم پلی گالاکتوروناز در فراکسیونهای مختلف از روش تست پلیت استفاده شد. مقدار پروتئین ، میزان فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیمی هر یک از فراکسیونهای شماره ۴۰ تا ۱۴۰ اندازه گیری و محاسبه گردید. نتایج حاصله نشان داد که فراکسیونهای شماره ۶۹ تا ۹۱ دارای فعالیت آنزیمی می‌باشند. بررسی نتایج حاصله نشان میدهد که فراکسیونهای شماره ۶۹ تا ۱۲۷ حاوی مقادیر مختلف پروتئین بوده در حالیکه فقط فراکسیونهای شماره ۶۹ تا ۹۱ که در ناحیه غلظت نمکی بین ۰/۵-۰/۳ mM از ستون خارج می‌شوند نشان دهنده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز می‌باشند (شکل ۱). فعالیت ویژه آنزیمی فراکسیونهای مختلف (۱ تا ۱۸ و ۶۹ تا ۹۱) محاسبه گردید. براساس نتایج بدست آمده فراکسیونهای شماره ۶۹ تا ۷۱ دارای بیشترین مقدار فعالیت ویژه آنزیمی (بین ۲۰۴ U/mg تا ۱۰۴ U/mg) بوده در حالیکه در فراکسیونهای شماره ۷۲ تا ۷۹ این فعالیت بین ۸۳ U/mg تا ۳۳ U/mg می‌باشد. ضمنا فراکسیونهای ۸۰ تا ۹۱ دارای فعالیت ویژه آنزیمی قابل ملاحظه ای نبودند (شکل ۲). جهت بررسی میزان خالص



شکل ۲- نمودار فعالیت ویژه آنزیمی هر یک از اجزای ستون کروماتوگرافی در جدایه F58 قارچ Fusarium oxysporum. محورهای عمودی از چپ به راست عبارتند از: فعالیت ویژه آنزیمی و غلظت نمک NaCl. محور افقی شماره اجزای متوالی را نشان می‌دهد

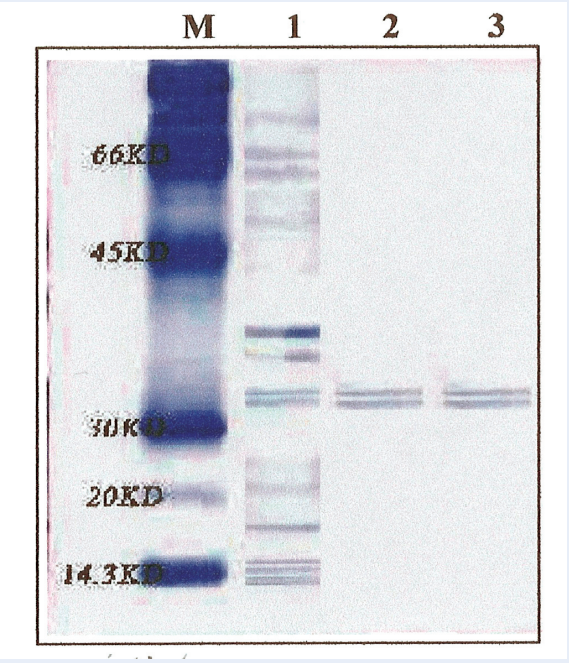
سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز توسط ستون, از SDS-PAGE استفاده گردید. بدین منظور با توجه به فعالیت ویژه آنزیمی, فراکسیونهای دارای خصوصیات نزدیک بهم مخلوط گردیدند. فراکسیونهای ۶۹ تا ۷۱ با بیشترین فعالیت ویژه آنزیمی و فراکسیونهای ۷۲ تا ۷۹ که فعالیت ویژه آنزیمی آنها کاهش می یابد بطور جداگانه با یکدیگر مخلوط شده و جمع آوری گردید. پروتئینهای موجود در نمونه های مخلوط شده پس از رسوب با استن سرد توسط SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفتند. بررسی الگوی پروتئینی مربوط به مخلوط فراکسیونهای شماره ۶۹ تا ۷۱ (ردیف ۲ شکل ۳) دو باند پروتئینی خالص شده با وزن ملکولی حدود ۳۳ و ۳۵ کیلو دالتون را نشان میدهد. ضمنا دو باند پروتئینی مشابه در الگوی پروتئینی مربوط به مخلوط فراکسیونهای ۷۲ تا ۷۹ مشاهده میگردد (ردیف ۳ شکل ۳).

جهت بررسی فعالیت آنزیمی دو باند خالص شده از تکنیک zymogram استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که هر دو باند دارای فعالیت پلی گالاکتوروناز می‌باشند (شکل ۴). برای بررسی و مقایسه pH مناسب جهت فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در مراحل قبل و بعد از خالص سازی از سوبسترای با pH های مختلف (۲/۵ تا ۸) استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشاندهنده بیشترین فعالیت آنزیم در هر دو حالت قبل و بعد از خالص سازی در pH=۴/۵ می‌باشد (شکل ۵).

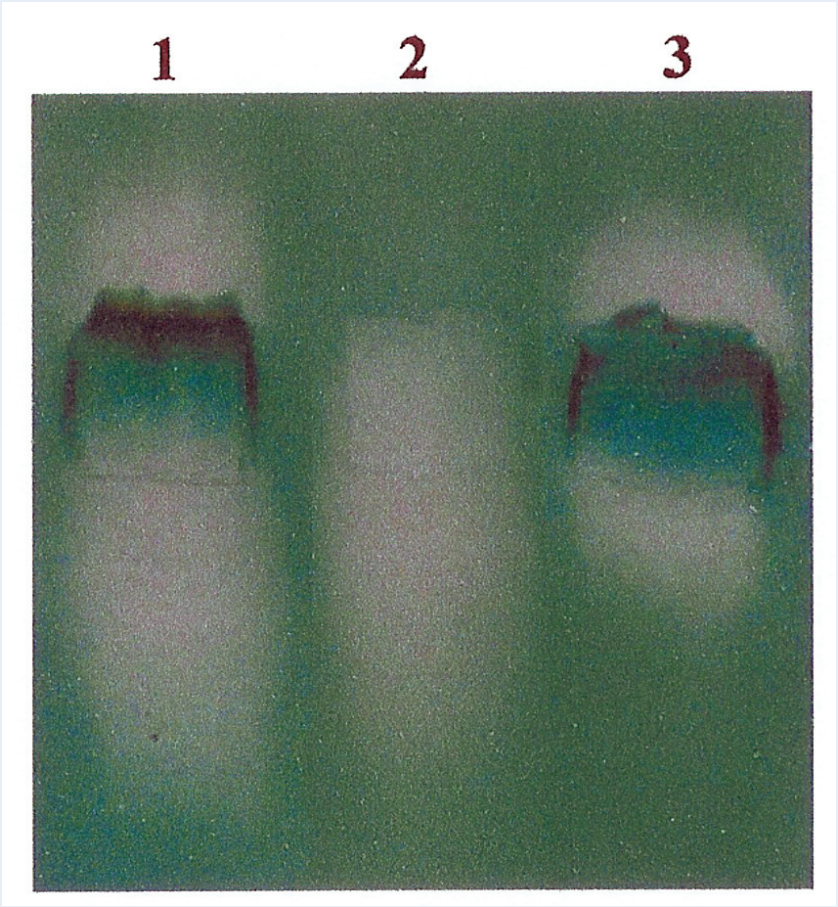
بحث

آنزیمهای پلی گالاکتوروناز از آنزیم‌هایی هستند که درمراحل اولیه ایجاد بیماری توسط قارچ *Fusarium oxysporum* ترشح می شوند (۲۳), این آنزیمها براساس خصوصیات عمل آنزیمی در تجزیه سوبسترا, به دو نوع اندوپلی گالاکتوروناز (بطور تصادفی پلیمر را شکسته) و اگزوپلی گالاکتوروناز (تجزیه کننده انتهایی) طبقه بندی می‌شوند. اندوپلی گالاکتورونازها با تخریب پکتین دیواره سلولی گیاهان و تولید الیگومرهای تحریک کننده سیستم دفاعی گیاهان (Elicitors) سبب سنتز فیتوالکسینها و پروتئینهای مهار کننده اندوپلی گالاکتورونازها (polygalacturonase inhibiting protein, PGIP) شده که به تبع آن این مهار کننده ها با اتصال به جایگاه فعال این آنزیمها سبب مهار از نوع رقابتی می‌شوند(۱۸). از طرفی عملکرد هیدرولازی اگزوپلی گالاکتورونازها بر روی زنجیره های پکتینی از ناحیه انتهایی و غیر احیایی آنها صورت میگیرد(۲۶). ضمن اینکه این آنزیمها سبب تجزیه محصول نهایی اندوپلی گالاکتورونازها به منو و دی گالاکترونیک اسید می‌شوند و این امر باعث از بین رفتن الیگومرهای تحریک کننده سیستم دفاعی گیاهان میگردد(۱۱). همچنین منو و دی گالاکتورنیک اسیدهای بدست آمده از عملکرد اگزوپلی گالاکتورونازها وارد سلولهای پاتوژن گردیده و با کاتابولیزه شدنشان باعث القاء سنتز سایر آنزیمهای پکتینی می‌شوند(۹).

www.SID.ir



شکل ۳- الگوی پروتئینی مربوط به پروتئین‌های جدایه F58 از نخود قارچ *Fusarium oxysporum* قبل و بعد از خالص‌سازی با استفاده از SDS-PAGE
M= مارکر پروتئینی، ۱= نمونه قبل از خالص‌سازی، ۲- فراکسیونهای ۷۱-۶۹، ۳= فراکسیونهای ۷۹-۷۲.



شکل ۴- الگوی *enzyme activity staining* مربوط به پروتئین‌های قبل و بعد از خالص‌سازی از جدایه F58 قارچ *Fusarium oxysporum*
۱= نمونه قبل از خالص‌سازی، ۲- فراکسیونهای ۱۰-۱، ۳= فراکسیونهای ۷۹-۶۹.

www.SID.ir

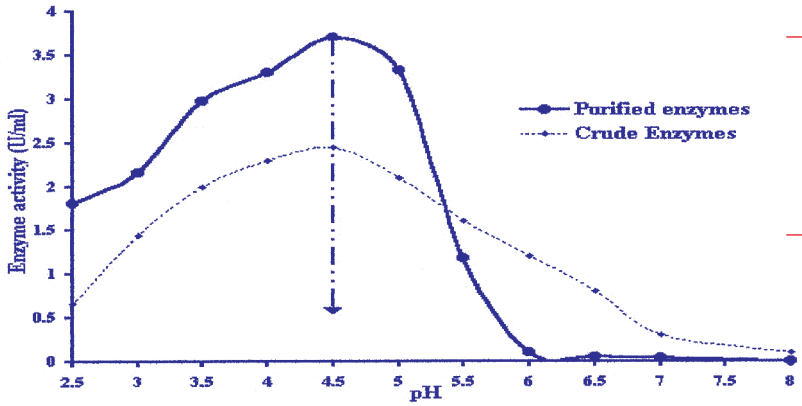
قارچهـای پاتـوژن گیاهی نسـبتهای متفاوتـی از دو نـوع آنزیم اندو و اگزوپلـی گالاکتوروناز را تولید می‌کنند بطوری کـه معمولاً در قارچهای با شـدت بیماریزایـی زیـاد (Highly Virulent, HV) میزان تولید آنزیم اگزوپلـی گالاکتوروناز نسـبت به فرم اندوپلی گالاکتوروناز بیشـتر بوده در صورتی که در قارچهای با شدت بیماریزایی کم (Weakly Virulent,WV) میزان تولید اندوپلی گالاکتوروناز نسبت به فرم اگزوپلی گالاکتوروناز زیادتر می‌باشـد(۱۷). بنابرایـن در این تحقیق اقدام به خالص سـازی آنزیم پلی گالاکتورونـاز از جدایه F۵۸ که دارای شـدت بیماریزایی کم بود گردید تا بتـوان عملکرد این آنزیـم را با فرم خالص آنزیم پلی گالاکتوروناز بدسـت آمده از جدایه F۲۳ با شـدت بیماریزایی زیاد (گزارش نگردیده است) مورد مقایسه قرار داد.

گزارشـهای متعددی نشاندهنده خالص سـازی آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچهـای مختلـف نظیـر *Rhizopus stolonifer, Fusarium oxysporum, Neurospora crassa* با استفاده از روش فیلتراسیون ژلی می‌باشـد (۴، ۱۵، ۱۹). در این تحقیق نیز ابتدا سـتونهای سفادکس G-۷۵ و G-۱۰۰ جهت تخلیص آنزیم پلی گالاکتوروناز مورد اسـتفاده قرار گرفتند. ستونهای سفادکس از نوع ستونهای فیلتراسیون ژلی می‌باشند و بر اساس size exclusion عمل می‌کنند اما علیرغم چندبار تکرار آزمایش، روش فوق الذکر قادر به جداسازی آنزیمهای مورد نظر نبود.

روشـهای کروماتوگرافـی تعویض یونی بـا اسـتفاده از چندین نوع از رزینهـای تعویـض یونی جهت تخلیص آنزیمها بـه کار می‌روند. با توجه به گزارشـهای موجـود در خصوص خالص سـازی آنزیم پلـی گالاکتوروناز با اسـتفاده از هر دو نوع سـتون تعویض کننده آنیونی و کاتیونی (۱۰ و ۲۰و ۲۴) در این تحقیق از هر دو بسـتر تعویض یونی اسـتفاده گردید. بسـتر DEAE-سـلولز که یـک تعویض کننده ضعیف آنیونی اسـت قادر به جدا سـازی آنزیمهای مورد نظر نبود. در ادامه از بستر تعویض کننده کاتیونی کربوکسی متیل سـفارز (CM-Sepharose fast flow) استفاده گردید کـه در ایـن روش دو باند پروتئینی (با وزن ملکولـی حدود ۳۳ و ۳۵ کیلو دالتون) خالص گردیدند. در ادامه، تکنیک زایموگرام جهت مطالعه فعالیت آنزیمی پروتئینهای خالص شده مورد استفاده قرار گرفت. از آنجا که ممکن اسـت ایزوزیم‌های مربوط به یک آنزیم جهت حرکت الکتروفورزی متفاوتی داشـته باشـند، بنابراین در صورت وجود ایزوزیم‌هـای مختلف، هر یک به صورت باندهای مجزایی مشـاهده خواهند شـد. همان‌گونه که در شکل ۴ ملاحظه می گردد وجود دو باند در نمونه‌های خالص سازی شده می‌تواند تا ییدکننده دو ایزوآنزیم مربوط به آنزیم پلی گالاکتوروناز باشـد. گزارشهای متعـددی نیز پس از خالص سـازی وجود دو ایزوآنزیـم متفاوت آنزیم پلی گالاکتوروناز از قارچهای مختلف را گزارش نموده اند (۴، ۱۰).

آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص شده از جدایه F۵۸ مورد مطالعه در این تحقیق در pH برابر۴/۵ دارای بیشـترین فعالیت می‌باشد. این یافته با pH گزارش شـده بـرای فعالیت آنزیم پلی گالاکتورونازی خالص شـده از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. cicera توسـط Artes and Tena مطابقت دارد(۴).

با توجه به نتایج بدسـت آمده در این تحقیق آنزیـم پلی گالاکتوروناز جدایـه F۵۸ قارچ *F. oxysporum* با شـدت بیماریزایـی کم میتواند توسـط سـتون CM-Sepharose Fast Flow به خوبی خالص شده تا از فرم خالص آن بتوان برای مقایسه عملکرد این آنزیم با آنزیم خالص شده از جدایه با شدت بیماریزایی زیاد قارچ *F. oxysporum* استفاده نمود.



شکل ۵- مقایسه آنزیم پلی گالاکتوروناز جدایه F58 قارچ *Fusarium oxysporum*. قبل از خالص‌سازی و فرم خالص شده آن در pHهای مختلف

منابع مورد استفاده

۱ - افشـاری آزاد، همایون، ۱۳۷۷ ، شناسـائی عوامل قارچی بیماری زردی نخود در ایران. سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۵-۱ شهریور، آموزشکده کشاورزی کرج

۲ - بهـداد , ابراهیم. ۱۳۵۹. اصول بیماریهای گیاهی. انتشـارات نشـاط اصفهان، ۲۵۰ صفحه.

۳ - منوچهـری، علی و مصری، علمداری. ۱۳۴۵، بیماری بوته زردی نخود ایرانی ، نشریه بیـماری های گیاهی ۳.

4 - Artes, E. P. , and Tena, M. 1990. Purification and characterization of pectic enzymes from two race of *Fusarium oxysporum* f.sp cicera differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology 37, 107-124.

www.SID.ir

5- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.

6- Cervone, F., Hahn, G., and DeLorenzo, G. 1989. Host-pathogen interactions . A plant converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. plant physiology 90, 542--548.

7- Clausen, C. A., and Green, F. 1996. Characterization of polygalacturonase from the brown-rot fungus Postia placenta. Appl. Microbiol. Biotech 45, 750-754.

8- Collmer, A., Ried, J. L., and Mount, M. S. 1988. Assay method for pectic enzymes. Method in Enzymology 161, 329 - 335.

9- Cooper, R. M. 1983. The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell walls by parasites. In Biochemical plant pathology: J.Wiley & Sons,New york), pp. 101-135.

10- Doneche, B., and Cabanne, C. 2002. Purification and characterization of two izozymes of polygalacturonase from botrytis cinerea. Effects of calcium ions on polygalacturonase activity. Mycrobiological Research 157, 1-7.

11- Favaron, F., Alghisi, P., Marciano, P., and Magro, P.1988. Polygalacturonase isoenzymes and oxalic acid produced by sclerotinia sclerotiorum. Physiological and molecular plant pathology 33, 107-124.

12- Gainvors, A., Nedjaoum, N., Gognies, S., Muzart, M., Nedjma, M., and Belarbi, A. 2000. Purification and characterization of acidic endo-polygalacturonase encoded by the PGL1-1 gene from Saccharomyces cerevisiae. FEMS-Microbiology-Letters; 183, 131-135.

13- Hoondal, G. S., Kapoor, M., and Beg, Q. K. 2000. Production and partial purification and characterization of a Thermo-alkali stable polygalacturonase from bacillus sp. MG-cp-2. Process biochemistry 36, 467-473.

14- Laemlli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of a head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

15- Manachini, P. L., Fortina, M. G., and Parini, C.1987. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolanifer*. Biotechnology Letters 9, 219-224.

16- Martinez, M. J., Alconada, M. T., Guillen, F., C.vazquez, and Reyes, F. 1991. Pectic activites from *Fusarium oxysporunm* f.sp Melonis : Purification and characterization of an exopolygalacturonase. FEMS Microbiology Letters 81, 145-150.

17- O'Brien P.A. & M.R. Zamani. 2003. Production of pectic enzymes by barepatch isolates of *Rhizoctonia solani* (AG-8). Australasian Plant Pathology, 32(1): 65-72.

18- Ovidio, R. D., Cervone, F., and Lorenzo, G. D. 2001. The role of PGIP Proteins in defence against pathogenic fungi. Annual review phytopathology 39, 313-335.

19- Polizeli, M., Jorge, J., and Terenzi, H. 1991. Pectinase production by Neurospora crassa: Purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. Journal of General Microbiology 137, 1815-1823.

20- Roncero, G., Isabel, M., and Pietro, A. D. (1997). Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp lycopersici. FEMS Microbiology Letters 154, 37-43.

21- Sathish, K. S., and Palanivelu, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15, 643-646.

22- Schell, M. A., Roberts, D. P., and Denny, T. P. 1988. Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* Polygalacturonase encoded by Pgl A and its involvement in phytopathogenicity. Journal of Bacteriology 170, 4501-4508.

23- Tugaye, E., Boudart, G., Dumas, B., and M.Therese. 2000. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. Plant Physiology and Biochemistry 38, 157-163.

24- Wakabayashi, K., and Huber, D. 2001. Purification and catalytic properties of polygalacturonase isoforms from ripe avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. Physiologia-Plantarum 113, 210-216.

25- Walton, D. J., Scott, J. S., Cervone, F., and Panaccione, D. G. 1990. Endopolygalacturonase is not required for pathogenecity of cochliobolus. The plant cell 2, 1191-1200.

26- Wojciechowicz, M., and Heinrichova, K. 1989. The pectinolytic enzymes of *Selenomonas ruminantium*. Journal of Applied Bacteriology 66, 169-174.

27- Zamani, M.R., Motallebi, M., and Harighi, M.J. 2001. Pectic enzyme paterns of *Fusarium oxysporum* isolates from chickpea in Iran. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 12 (1) , 17-21.

Archive of SID

www.SID.ir