



# مطالعه آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Fusarium oxysporum* (F58) 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 این تحقیق از تکنیک کروماتوگرافی تبادل یونی از نوع کاتیونی (CM-Sephrose Fast Flow) جهت خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز از جدایه F58 (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 بدست آمده از الگوی پروتئینی، وجود دو باند با وزنهای مولکولی حدود ۳۳ و ۳۵ کیلو دالتون در جدایه F58 را نشان داد. مطالعه رنگ آمیزی فعالیت آنزیم (Enzyme activity staining)، دو باند مشخص مربوط به آنزیمهای خالص شده را نشان داد که دلالت بر ایزوآنزیمهای این آنزیم دارد. ضمناً 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

Pajouhesh & 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, Natiatul 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,

including *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 solani* و *Fusarium oxysporum* Schlecht Kuhn می‌باشند (۱). خسارت‌ها به اشکال مختلفی توسط این عامل بیماری زا در نخود ایجاد می‌شود. از جمله می‌توان به زرد شدن و ریختن برگ‌های گیاه آلوده، ضعیف شدن بوته و تاثیر گذاشتن در فتوسنتز که باعث کوچک ماندن و تقلیل تعداد دانه می‌شود 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 ۱-۴ 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 حمله دیگر

پاتوژنهای گیاهی می‌گردند (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 می‌دهند. با این وجود آنزیمهایی از این دسته در باکتری ۲-cp-MG sp. Bacillus 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 می‌تواند 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 برابر ۷ را از خود نشان می‌دهد. 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 خالص سازی گردیده است (۴، ۱۶، ۲۰). همچنین این آنزیم از قارچهای دیگری نظیر *Neurospora crassa* Aspergillus sp., *Postia placenta*, *Termomyces Botrytis cinerea* و *lanuginosus*, *Saccharomyces cervicee* 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 (F58) با شدت بیماریزایی کم (Weakly virulent, WV) قارچ *F. oxysporum* که از گیاه نخود آلوده از استان آذربایجان شرقی بدست بود، استفاده گردید.

## 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 و ۰/۱۴ گرم سولفات منیزیم اضافه شد. pH محیط فوق برابر ۴/۵ تنظیم گردید.

### اندازه گیری فعالیت آنزیم پلی گالاکتورناز

فعالیت آنزیم پلی گالاکتورناز با استفاده از روش Collmer و همکاران (۸) همراه با تغییراتی، به شرح زیر اندازه گیری شد. ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی پلی گالاکتورناز با ۲۱۰ میکرولیتر محلول ذخیره سوپسترا حاوی ۰/۳ درصد (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 آرسنومولیدات (۵٪ w/v) آمونیم مولیدات، ۱۶٪ (w/v) دی سدیم هیدروژن آرسنات و ۴/۲٪ (v/v) اسید سولفوریک ۹۶٪] به مخلوط اضافه و سانتیفریژ شده (۱۲۰۰۰ Xg) و میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر خوانده شد. اندازه گیری فعالیت آنزیم برای هر جدایه در سه تکرار انجام شد. در این آزمایش از دی-گالاکتورونیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد. در این شرایط یک واحد آنزیم در مدت ۲۰ دقیقه تشکیل یک میکرومول اولیگوگالاکتورونیک را می دهد.

### کروماتوگرافی تعویض یونی بر روی بستر CM-Sephrose Fast Flow

یک ستون کروماتوگرافی به ابعاد ۲۵ × ۲ سانتی متر (ارتفاع × قطر) انتخاب گردید. مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از بستر CM-Sephrose Fast Flow که به صورت 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 برابر ۵/۵) اضافه و مخلوط گردید. پس از ۱۵ دقیقه ساکن گذاشتن مخلوط و ته نشین شدن بستر، بافر رویی تعویض می گردد. 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 گالاکتورناز ابتدا جدایه F۵۸ قارچ در محیط کشت مایع PZ در حالت Shaking به مدت ده روز کشت داده شدند. سپس رسوب دهی پروتئین ها با سولفات آمونیم انجام گرفت. پروتئین های 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 پروتئین های 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 به صورت یک مرحله ای با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه شستشو داده و زمان کافی را در نظر گرفته تا شستشوی پروتئین هایی که در لابلای بستر مانده و متصل نشده اند نیز انجام گیرد. محلول خروجی ستون مربوط به شستشو در نمونه های ۲ میلی لیتری توسط دستگاه نمونه گیر (Fraction collector) جمع آوری و مقدار جذب نوری پروتئین های متصل نشده در ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید. بعد از اینکه مقدار جذب نوری پروتئین های متصل نشده به ستون در نمونه های جمع آوری شده به صفر رسید برای جداسازی پروتئین های متصل شده به گروه های عمل کننده بستر، از دستگاه گرادیان ساز استفاده شد که در طرف اول آن ۱۰۰ میلی لیتر بافر شست و شو دهنده و در طرف دوم ۱۰۰ میلی لیتر بافر جدا کننده (۱ mm NaCl) ریخته شد و به کمک همزن مغناطیسی (با ایجاد گرادیان خطی بافر جدا کننده (mm NaCl) ۱-۰) پروتئین های متصل شده به ستون جدا شدند. سرعت جریان بافر ۱ میلی لیتر در دقیقه و حجم نمونه های جمع آوری شده بمیزان ۲ میلی لیتر تنظیم گردید. سپس نمونه های حاوی بیشترین فعالیت آنزیمی جمع آوری و مخلوط شده و پس از افزودن حجم برابر از استون سرد (۲۰ درجه سانتیگراد)، به وسیله سانتیفریژ در ۱۴۰۰۰g رسوب داده شدند.

### بررسی الگوی پروتئینی

جهت بررسی پروتئینهای ترشچی و رسوب دهی آنها از دو روش استفاده گردید: استفاده از استن و نمک های معدنی. در روش رسوب دهی با استفاده از استن، محلول حاوی پروتئین ترشچی 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 ۱۴۰۰۰g و بمدت ۳۰ دقیقه سانتیفریژ گردید. رسوب حاصله در کمترین حجم آب مقطر دو بار تقطیر حل شده و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. در روش رسوب دهی با نمک های معدنی از سولفات آمونیوم ۷۰٪ استفاده گردید. در این روش مقدار ۷۰ گرم سولفات آمونیوم در ۱۰۰ میلی لیتر محلول حاوی پروتئین ترشچی به آرامی حل گردید. محلول نیمه اشباع حاصل حدود ۱۲ ساعت در دمای (۲۰ درجه سانتیگراد) قرار داده شد. آنگاه پس از ۳۰ دقیقه سانتیفریژ با سرعت ۱۴۰۰۰g، رسوب حاصله در یک میلی لیتر آب مقطر سه بار تقطیر کاملاً حل شد و پس از انتقال به لوله های اپندورف، در ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش Bradford (۵) استفاده شد

۸) و ۴۰ میلی لیتر 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 ۱۵ از هر نمونه روی پلیت نقطه گذاری و به مدت یک و نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس پلیتها ۱۵ دقیقه با رنگ اختصاصی Ruthenium red ۰/۵/۰ درصد رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو، نمونه های دارای فعالیت آنزیمی به صورت لکه هایی روشن بر روی پلیت مشاهده می شدند.

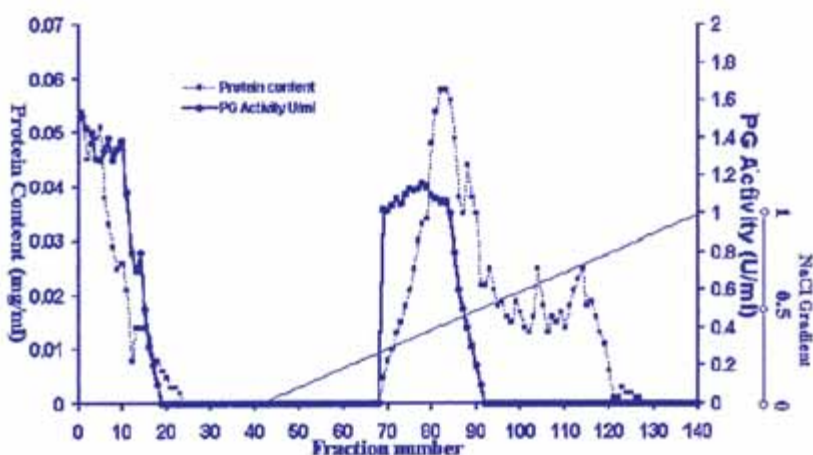
### Zymogram

جهت بازیابی فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز بعد از الکتروفورز بر روی ژل پکتین اکریل امید 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 F58 از قارچ *Fusarium oxysporum* که از جدایه های با شدت بیماریزایی کم (۲۷) (WV) در گیاه نخود می باشد انتخاب شده و خالص سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز آن با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد.

به منظور افزایش کارایی استون مورد استفاده، شرایطی مورد بررسی قرار گرفت که در آن شرایط بیشترین پروتئین مورد نظر به صورت اختصاصی به ستون متصل شده و پروتئین های دیگر تا حد امکان به بستر متصل نگردند. اتصال به بستر با واسطه بر هم کنش های 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 می باشد. 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 می دهد.

که در آن از پروتئین BSA (Bovine serum albumin) به عنوان استاندارد استفاده گردید. برای مشخص کردن خلوص پروتئین از SDS-PAGE به روش Laemli, ۱۹۷۰ استفاده گردید (۱۴). الکتروفورز در سیستم ناپیوسته (Stacking، ۵٪ و Resolving، ۱۲٪) 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 انهدراز 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.

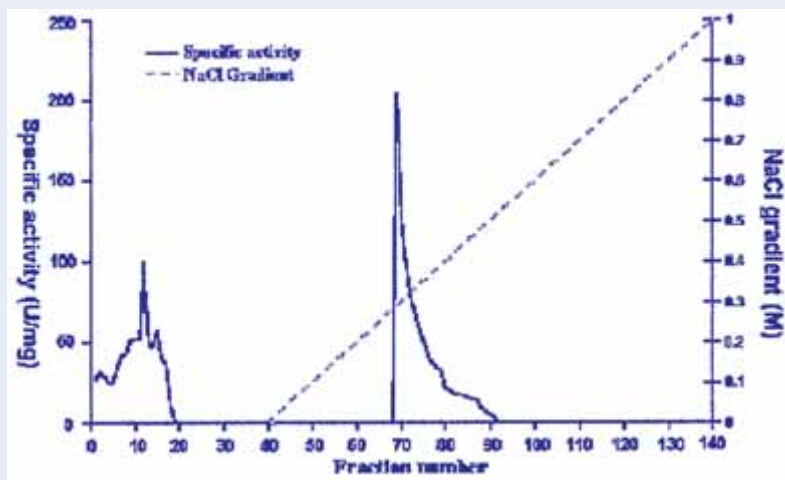
### تعیین pH مناسب برای اتصال پروتئین به بستر و فعالیت آنزیمی

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 بافر استات 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 بالای در ۲۸۰ نانومتر و نیز فعالیت آنزیمی آنها اندازه گیری شد.

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



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 گالاکتورناز 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 می‌یابد بطور جداگانه با یکدیگر مخلوط شده و جمع آوری گردید. پروتئینهای موجود در نمونه‌های 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. ضمناً 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 گالاکتورنازی می‌باشند (شکل ۴). برای بررسی و مقایسه pH مناسب جهت فعالیت آنزیم پلی گالاکتورناز 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 گالاکتورنازی از آنزیمهایی هستند که در مراحل اولیه ایجاد بیماری توسط قارچ *Fusarium oxysporum* ترشح می‌شوند (۲۳). این آنزیمها براساس خصوصیات عمل آنزیمی در تجزیه سوبسترا، به دو نوع اندوپلی گالاکتورناز (بطور تصادفی پلیمر را شکسته) و اگزوپلی گالاکتورناز (تجزیه کننده انتهایی) طبقه بندی می‌شوند. اندوپلی گالاکتورنازها با تخریب پکتین دیواره سلولی گیاهان و تولید الیگومرهای تحریک کننده سیستم دفاعی گیاهان (Elicitors) سبب سنتز فیتوالکسینها و پروتئینهای مهار کننده اندوپلی گالاکتورنازها (polygalacturonase inhibiting protein, PGIP) شده که به تبع آن این مهار کننده‌ها با اتصال به جایگاه فعال این آنزیمها سبب مهار از نوع رقابتی می‌شوند (۱۸). از طرفی عملکرد هیدرولازی اگزوپلی گالاکتورنازها بر روی زنجیره های پکتینی از ناحیه انتهایی و غیر احیایی آنها صورت می‌گیرد (۲۶). ضمن اینکه این آنزیمها سبب تجزیه محصول نهایی اندوپلی گالاکتورنازها به منو و دی گالاکتورونیک اسید می‌شوند و این امر باعث از بین رفتن الیگومرهای تحریک کننده سیستم دفاعی گیاهان می‌گردد (۱۱). همچنین منو و دی گالاکتورونیک اسیدهای بدست آمده از عملکرد اگزوپلی گالاکتورنازها وارد سلولهای پاتوژن گردیده و با کاتابولیزه شدنشان باعث القاء سنتز سایر آنزیمهای پکتینی می‌شوند (۹).

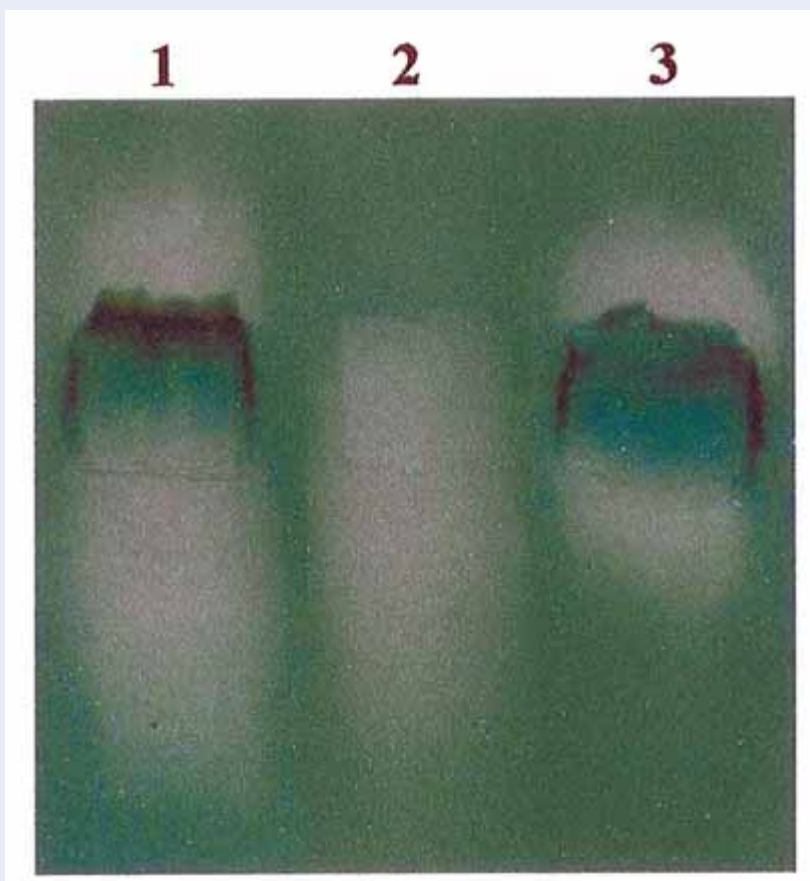
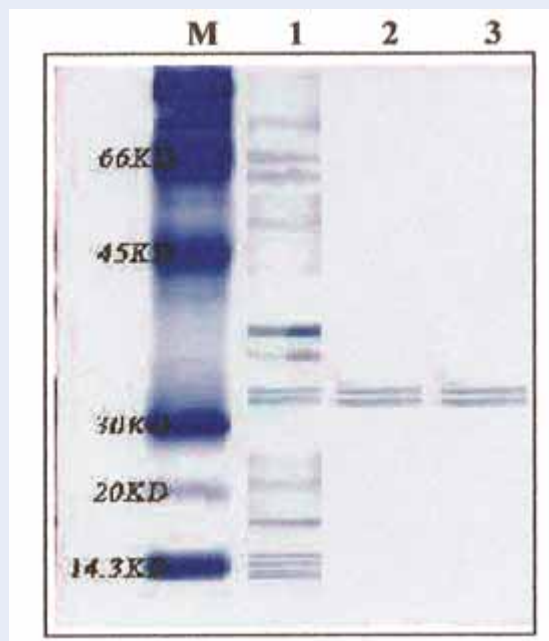
محسوسی را نشان می‌دهند. جذب پائین در ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده اتصال بیشتر پروتئین‌ها به ستون بوده ضمن اینکه فعالیت آنزیمی کم محلول روی بستر بیابگر اتصال اختصاصی آنزیم به بستر می‌باشد.

برای خالص سازی آنزیم پلی گالاکتورناز، 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 گالاکتورناز 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 گالاکتورناز 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 گالاکتورنازی 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. ضمناً فراکسیونهای ۸۰ تا ۹۱ دارای فعالیت ویژه آنزیمی قابل ملاحظه ای نبودند (شکل ۲). جهت بررسی میزان خالص

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.

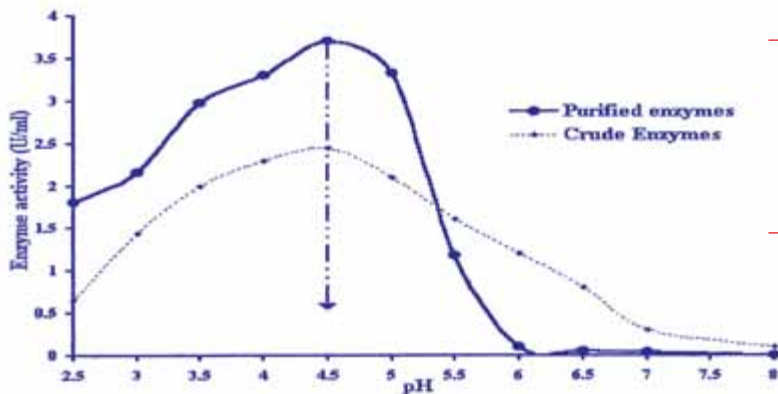
است ایزوزیم‌های مربوط به یک آنزیم جهت حرکت الکتروفورزی متفاوتی داشته باشند، بنابراین در صورت وجود ایزوزیم‌های مختلف، هر یک به صورت باندهای مجزایی مشاهده خواهند شد. همان‌گونه که در شکل ۴ ملاحظه می‌گردد وجود دو باند در نمونه‌های خالص سازی شده می‌تواند تا پید کننده دو ایزوآنزیم مربوط به آنزیم پلی گالاکتورناز باشد. گزارشهای متعددی نیز پس از خالص سازی وجود دو ایزوآنزیم متفاوت آنزیم پلی گالاکتورناز از قارچهای مختلف را گزارش نموده اند (۴، ۱۰).

آنزیم پلی گالاکتورناز خالص شده از جدایه F58 مورد مطالعه در این تحقیق در pH برابر ۴/۵ دارای بیشترین فعالیت می‌باشد. این یافته با pH گزارش شده برای فعالیت آنزیم پلی گالاکتورنازی خالص شده از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. cicera توسط Artes and Tena مطابقت دارد (۴).

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق آنزیم پلی گالاکتورناز جدایه F58 قارچ *F. oxysporum* با شدت بیماریزایی کم میتواند

قارچهای پاتوژن گیاهی نسبتهای متفاوتی از دو نوع آنزیم اندو اگزوپلی گالاکتورناز را تولید می‌کنند بطوری که معمولا در قارچهای با شدت بیماریزایی زیاد (Highly Virulent, HV) میزان تولید آنزیم اگزوپلی گالاکتورناز نسبت به فرم اندوپلی گالاکتورناز بیشتر بوده در صورتی که در قارچهای با شدت بیماریزایی کم (Weakly Virulent, WV) میزان تولید اندوپلی گالاکتورناز نسبت به فرم اگزوپلی گالاکتورناز زیادتر می‌باشد (۱۷). بنابراین در این تحقیق اقدام به خالص سازی آنزیم پلی گالاکتورناز از جدایه F58 که دارای شدت بیماریزایی کم بود گردید تا بتوان عملکرد این آنزیم را با فرم خالص آنزیم پلی گالاکتورناز بدست آمده از جدایه F23 با شدت بیماریزایی زیاد (گزارش نگردیده است) مورد مقایسه قرار داد.

گزارشهای متعددی نشاندهنده خالص سازی آنزیم پلی گالاکتورناز قارچهای مختلف نظیر *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum*, *Neurospora crassa* با استفاده از روش فیلتراسیون



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

توسط ستون CM-Sephrose 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.

### منابع مورد استفاده

- ۱- افشاری آزاد، همایون، ۱۳۷۷، شناسائی عوامل قارچی بیماری زردی نخود در ایران. سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، ۵-۱ شهریور، آموزشکده کشاورزی کرج
- ۲- بهداد، ابراهیم، ۱۳۵۹. اصول بیماریهای گیاهی. انتشارات نشاط اصفهان، ۲۵۰ صفحه.
- ۳- منوچهری، علی و مصری، علمداری. ۱۳۴۵، بیماری بوته زردی نخود ایرانی، نشریه بیماری 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.

ژلی می‌باشد (۴، ۱۵، ۱۹). در این تحقیق نیز ابتدا ستونهای سفادکس G-۷۵ و G-۱۰۰ جهت تخلیص آنزیم پلی گالاکتورناز مورد استفاده 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.

روشهای کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از چندین نوع از رزینهای تعویض یونی جهت تخلیص آنزیمها به کار می‌روند. با توجه به گزارشهای موجود در خصوص خالص سازی آنزیم پلی گالاکتورناز با استفاده از هر دو نوع ستون تعویض کننده آنیونی و کاتیونی (۱۰ و ۲۰ و ۲۴) در این تحقیق از هر دو بستر تعویض یونی استفاده گردید. بستر DEAE-سلولز که یک تعویض کننده ضعیف آنیونی است قادر به جدا سازی آنزیمهای مورد نظر نبود. در ادامه از بستر تعویض کننده کاتیونی کربوکسی متیل سفارز (CM-Sephrose fast flow) استفاده گردید که در این روش دو باند پروتئینی (با وزن ملکولی 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

- 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 isozymes 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 stolonifer*. *Biotechnology Letters* 9, 219-224.
- 16- Martinez, M. J., Alconada, M. T., Guillen, F., C.vazquez, and Reyes, F. 1991. Pectic activities from *Fusarium oxysporum* 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 pathogenicity 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 patterns of *Fusarium oxysporum* isolates from chickpea in Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 12 (1) , 17-21.

