بررسی فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز مترشحه از ایزوله‌های ایرانی قارچ *Fusarium oxysporum*

محمدرضا زمانی، مصطفی مطلبی و محمدعلی عارف پورترابی

استادیاران و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی گروه

زیست شناسی دانشگاه رازی - کرمانشاه

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۱۱/۲۷

خلاصه

دراین تحقیق شدت بیماریزایی و میزان تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز (PG) در پانزده ایزوله قارچ *Fusarium oxysporum* جمع آوری شده ازمناطق مختلف ایران موردبررسی و مطالعه قرارگرفت. دراین آزمایش از نخودایرانی رقم جم و باکشت ایزوله‌ها در چهارمحیط کشت مختلف جهت تعیین شدت بیماریزایی استفاده گردید. آسیبهای ناشی ازحمله قارچ به قسمتهای مختلف گیاهچه بطور روزانه تا روز پنجم موردمطالعه قرارگرفت. در هرموردسه تکرار و در هر تکرار دوازده گیاهچه مورد بررسی واقع شد. برحسب گیاهچه‌های نکروزه شده و آسیب دیده توسط ایزوله‌های مختلف، چهارایزوله (F15,F18,F23,F47) که بیش از ۴۵٪ آلودگی ایجاد میکردندبا شدت بیماریزایی زیاد (Highly virulent,HV) و دوایزوله (F21,F58) که کمتر از ۲۵٪ آلودگی ایجاد می‌کردند با شدت بیماریزایی کم (Weakly virulent,WV) مشخص وتعیین گردیدند. دو دسته فوق ازنظرمیزان رشد، تولید پروتئین و فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز مورد مقایسه قرارگرفتند. نتایج حاصله نشان داد که میزان رشد و تولید پروتئین‌های مترشحه دو دسته فوق با هم تفاوت محسوسی نداشتند، در صورتیکه آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در چهارایزوله HV دارای فعالیت بیشتری نسبت به دو ایزوله WV بود.

واژه‌های کلیدی: فوزاریوم، پلی‌گالاکتوروناز، آنزیمهای پکتیکی ، بیماریزایی

مقدمه

یکی از مهمترین بیماری‌ها در نخود معمولی *Cicer arietinum* بیماری زردی است که عامل آن قارچ *Fusarium oxysporum* و *F. solani* kuehn میباشد و میزان خسارت وارده به این گیاه در بعضی از مزارع توسط این بیماری تا ۷۵٪ برآورد گردیده‌است(۱). عوامل بیماریزای گیاهان مقدار زیادی از آنزیمهایی راکه قادر به تخریب ترکیبات ساختمانی دیواره سلولی گیاه هستند تولید میکنند(۱۴). توانایی عوامل بیماریزای گیاهان برای تولید آنزیمهایی که پلی‌ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاه را تجزیه میکنند احتمالاً اولین مرحله در فرآیندهای بیماریزایی میباشد(۱۵ و ۱۷). این آنزیمها معمولاً ترشحی هستند و دارای وزن ملکولی کم می باشند (۶ و ۸). آنزیمهای مذکور معمولاً بصورت ایزوآنزیمهای مختلفی تولید می شوند که از نظر اندازه، بارالکتریکی، پایداری و توانایی برای تخریب دیواره‌های سلول مختلف هستند(۵ و ۶ و ۱۳). آنزیمهای تجزیه کننده پکتین از جمله پلی‌گالاکتوروناز، پکتین‌لیاز، پکتات‌لیاز و پکتین‌استراز، اغلب آنزیمهای ترشحی بوده که جهت ایجاد بیماری توسط قارچ فوزاریوم ترشح میشوند(۶ و ۱۳ و ۲۱).

تولید آنزیمهای پکتیکی، همانند پکتات لیاز و پکتین‌استراز برای تخریب کامل پکتین لازم می باشد(۱۰). اهمیت

پلی‌گالاکتوروناز در بیماریزایی بعضی از عوامل بیماریزا اثبات شده است. گزارش‌ها نشان داده که *F. oxysporum* تولید اندوپلی گالاکتوروناز خارج سلولی میکند که باعث ایجاد آلودگی در گیاه گوجه‌فرنگی میگردد(۶ و ۸). همچنین اگزوپلی‌گالاکتوروناز در بعضی بیماریهای گیاهی از جمله در پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی که بوسیله *F. oxysproum* schiecht: fr f.sp (Sacc) Smyder & Hans. *lycopersici* ایجاد میشود یک نقش مهم را بازی میکند(۷).

در این تحقیق ایزوله‌های مختلف قارچ *F. oxysporum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، از نظر شدت بیماریزایی و فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز مورد بررسی و مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد و روشها

ایزوله‌های مختلف *F. oxysporum*: ایزوله‌های *F. oxysporum* که در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند بومی ایران بوده و محل جمع‌آوری آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

محیط کشت و نگهداری قارچ: ۸۰ گرم گندم در داخل شیشه شیر ریخته شد، و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه گذاشته شد تا گندمها جوانه بزنند سپس سترون گردید. قارچهای رشد یافته در محیط Potato Dextrose Agar, PDA، به آن اضافه گردید و برای رشد در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد به مدت پنج روز قرار داده شد و سپس در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

محیط کشت زایموگرم (Pectic Zymogram medium, PZ): برای فراهم نمودن شرایط مناسب جهت تولید آنزیمهای پکتینی توسط ایزوله‌های مختلف قارچ *F. oxysporum* از محیط کشت PZ معرفی شده توسط سویتینگهام و همکاران ۱۹۸۶ (۲۰) استفاده گردید. ۱۰ گرم پکتین (Citrus pectin, Merck) را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کردیم و به آن ۲۰ گرم آگار، ۲/۶۴ گرم سولفات‌آمونیوم، ۰/۳۴ گرم دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات و ۰/۱۴ گرم سولفات‌منیزیم اضافه شد. pH محیط فوق برابر ۴/۵ تنظیم گردید. برای تهیه محیط کشت مزبور بصورت مایع طبق همین دستور بدون اضافه کردن آگار باید عمل نمود.

محیط کشت واتر آگار (Water Agar, WA): ۲۰ گرم آگار را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بر روی شعله حل نموده و پس از سترون شدن توسط اتوکلاو بین پلیتها تقسیم گردید.

محیط کشت PDA: ۳۹ گرم محیط کشت PDA را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و بر روی شعله حرارت داده شد تا محیط شفاف گردد و سپس توسط اتوکلاو سترون گردید.

محیط کشت Czapeck - Dox: ۴۸ گرم محیط کشت Czapeck Dox - را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و بر روی شعله حرارت داده شده تا محیط شفاف گردد و سپس توسط اتوکلاو سترون گردید.

تعیین شدت بیماریزایی: برای تعیین شدت بیماریزایی، ایزوله‌ها بر روی محیطهای کشت Czapek - Dox, PDA, WA و PZ کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. تا قارچ رشد کند و قطر کلنی آن به ۴ سانتیمتر برسد. از طرفی نخودها (رقم جم) را با آب ژاول ۲ درصد ضدعفونی کردیم و در داخل پلیت استریل قرار دادیم تا ریشه بزنند.وقتی که اندازه ریشه به ۲ سانتیمتر رسید، طبق روش یانگ ۱۹۹۳ و دولمانس و همکاران ۱۹۹۵ (۲۲ و ۹) گیاهچه‌ها را مماس بر کلنی قارچ قرار دادیم و تا مدت ۱۲۰ ساعت نگهداری کردیم. هر ۲۴ ساعت یکبار از ریشه‌های آلوده یادداشت برداری گردید. در هر مورد سه تکرار و در هر تکرار دوازده گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت بر اساس درصد آلودگی ایجاد شده، قارچها به دو دسته تقسیم گردیدند: قارچهایی که بیش از ۴۵٪ آلودگی ایجاد می کردند بعنوان قارچهای با شدت بیماریزایی زیاد (Highly Virulent, HV) و قارچهایی که کمتر از ۲۵٪ آلودگی ایجاد می کردند بعنوان قارچهای با شدت بیماریزایی کم (Weakly Virulent, WV).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز: جهت بررسی نقش آنزیم پلی گالاکتوروناز در قارچ *F. oxysporum* شرایط مناسب برای تولید فعالیت این آنزیم در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. بدین منظور یک ایزوله از قارچ مذکور را بصورت تصادفی انتخاب نموده و در ۱۰ ml محیط کشت PZ بمدت ده روز کشت داده شد. برای بدست آوردن شرایط مناسب پارامترهای مختلفی نظیر pHهای متفاوت (۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶،

۷، ۸ و ۹)، روزهای مختلف (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ روز) و دو حالت با بهم زدن (۱۰۰ دور در دقیقه) و ثابت مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. در هر یک از حالتهای فوق، میسلیوم قارچها در محیطهای کشت مربوطه را توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک جمع آوری نموده و محیط صاف شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ (۱۲۰۰۰g) گردید. محلول بدست آمده بعنوان محلول حاوی آنزیمهای مترشحه در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز با استفاده از روش کولمر ۱۹۸۷ (۴) همراه با تغییراتی، به شرح زیر اندازه‌گیری گردید. ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۲۱۰ میکرولیتر محلول ذخیره سوبسترا در لوله اپندورف مخلوط شده، و برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. واکنش با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر معرف مس و نیز قرار دادن در حمام آب جوش بمدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. پس از سرد شدن ۵۰۰ میکرولیتر معرف آرسنومولیبدات به مخلوط اضافه و سانتریفوژ شده و جذب نوری در طول موج ۵۰۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر خوانده 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.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین: برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین در محیط کشت از روش برادفورد ۱۹۷۶ (۳) استفاده گردید. این روش بر اساس باند شدن رنگ آبی کوماسی (Coomassie Breliant Blue G250) به پروتئین می‌باشد. در pH اسیدی محیط، رنگ به حالت کاتیونی درآمده، که در این حالت فاقد جذب قوی در طول موج ۵۹۵ نانومتر می‌باشد، ولی وقتی رنگ به پروتئین متصل گردید با گرفتن دو پروتون به حالت آنیونی درآمده و پایدار می‌گردد. در این حالت جذبی قوی در طول موج ۵۹۵ نانومتر خواهد داشت.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین محیط ۱۰ میکرولیتر از محلول روئی با ۱۹۰ میکرولیتر از محلول بافری مخلوط شد سپس ۲ میلی‌لیتر معرف پروتئینی به آن اضافه شده و به شدت تکان داده شد. بعد از حداقل ۲۰ دقیقه (بهترین زمان از ۲ دقیقه تا ۲۰ دقیقه‌است) میزان جذب نوری ماده رنگی فوق در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای بدست آوردن مقادیر پروتئین، با استفاده از جذب نوری بدست آمده می‌بایست آنها را با مقادیر جذب نوری استاندارد در قالب منحنی استاندارد مقایسه کنیم. با استفاده از محلول پروتئینی که حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر پروتئین بوین سرم آلبومین (BSA) می‌باشد، غلظتهای مشخصی از پروتئین تهیه و بعد از ۲۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد با استفاده از این دو پارامتر (غلظتهای مختلف پروتئین و جذب نوری حاصل از این غلظتها) رسم گردید و با مقایسه مقادیر جذب نوری نمونه‌های مربوط به ایزوله‌ها با نمونه‌های استاندارد، میزان پروتئین نمونه‌های مربوط به ایزوله‌ها محاسبه شد.

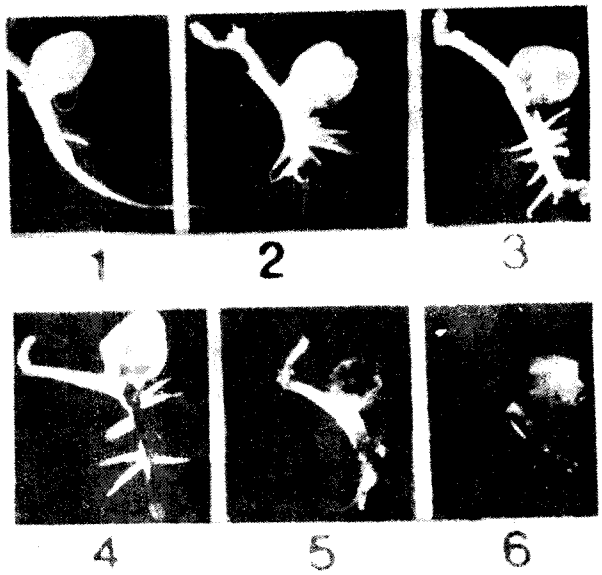
مطالعه میزان رشد: برای بررسی میزان رشد قارچها از وزن خشک آنها بعنوان شاخص رشد استفاده گردید. ایزوله‌های مورد مطالعه (پانزده ایزوله) در محیط کشت PZ با pH= ۴/۵ همراه با بهم زدن کشت داده شدند. پس از ۶ روز توسط کاغذ صافی واتمن شماره یک. میسیلیومها جمع آوری و بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد خشک گردیده و وزن آنها اندازه‌گیری شد.

نتایج

تعیین شدت بیماریزایی: برای مطالعه شدت بیماریزایی از روش آزمایشگاهی یانگ ۱۹۹۳ و دولمانس و همکاران ۱۹۹۵ (۲۰ و ۹) جهت بررسی صدمات وارد به گیاهچه نخود استفاده گردید. میزان صدمات وارده به گیاهچه‌های نخودها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته و یادداشت برداری شد (شکل ۱).

مطالعه و بررسی میزان صدمات وارده به گیاهچه نخودها نشان داد که بهترین زمان برای تعیین شدت بیماریزایی ایزوله‌ها ۷۲ ساعت پس از قرار دادن نخودها در محیط کشت و در معرض ایزوله‌های قارچ میباشد (شکل ۲). با توجه به نتایج بدست آمده در چهار محیط کشت انتخابی از بین پانزده ایزوله قارچ *F. oxysporum* چهار ایزوله F15, F18, F23 و F47 که بیش از ۴۵٪ آلودگی را ایجاد می‌کردند بعنوان HV و دو ایزوله F21 و F58 با کمتر از ۲۵٪ ایجاد آلودگی بعنوان WV شناسایی شدند (شکل ۱).

بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز: برای بدست آوردن شرایط بهینه جهت تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز توسط ایزوله‌های مختلف قارچ *F. oxysporum* از ایزوله F25 که بصورت تصادفی



شکل ۱ - میزان صدمات وارده بر کیاهچه نخود توسط قارچ فوزاریوم : شماره ۱، شاهد، شماره۲، و ۳ کمتراز ۲۵٪ آلودگی، شماره ۴،۵ و ۶ بیشتر از۴۵٪ آلودگی

شکل ۲ - نحوه قرار داد نخودهای جوانه زده در مجاورت قارچ رشد یافته در محیط کشت و آلوده شدن آنها

انتخاب شده بود استفاده گردید. برابر روش ذکر شده در بخش مواد و روشها میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در pHها و روزهای مختلف در صورت وجود بهم زن (که هوادهی را افزایش می‌دهد) نسبت به شرایط ثابت به طور محسوسی افزایش می‌یافت (جدول ۲). از طرفی با مقایسه فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ در حالتهای مختلف مشخص گردید که فعالیت این آنزیم معمولاً در روز ششم به حداکثر میزان فعالیت خود می رسد (جدول ۲ و شکل ۳). همچنین بررسی فعالیت این آنزیم در pHهای مختلف نشان داد که فعالیت آنزیم در pH=۴/۵ به حداکثر میزان خود میرسد(جدول ۲ و شکل ۴).

بررسی نتایج بدست آمده از شرایط فوق نشان داد که احتمالاً بهترین شرایط برای کشت ایزوله‌ها و مطالعه و بررسی فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در محیط کشت PZ، pH= ۴/۵، شش روز کشت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و وجود بهم زن می‌باشد.

بنابراین جهت مطالعه فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در ایزوله‌های مورد بررسی از شرایط مناسب بدست آمده فوق استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که دو ایزوله F21 و F58 هیچگونه فعالیتی را نشان نداده در صورتیکه چهار ایزوله F47,F23,F18,F15 دارای بیشترین فعالیت بوده و فعالیت آنزیمی سایرایزوله‌ها بین این دو دسته قرار میگیرد(شکل‌های ۵ و ۶).

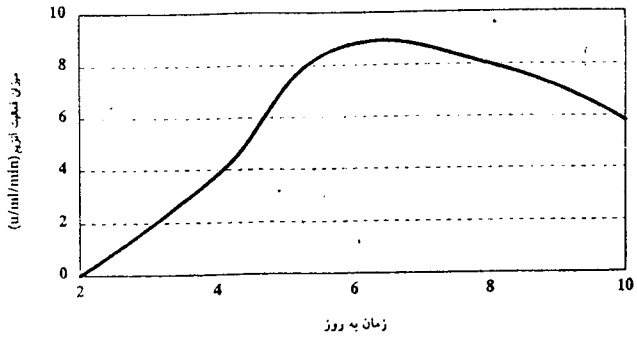
مطالعه میزان رشد و تولید پروتئین: همانگونه که در قسمت فوق مشاهده گردید دو ایزوله F21 و F53 که بعنوان WV شناسایی شدند، فاقد فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز میباشد. در پاسخ به این سئوال که آیا عدم فعالیت آنزیمی در این ایزوله‌ها از خصوصیات ذاتی آنها بوده و یا به میزان رشد ایزوله‌ها در محیط کشت بستگی دارد، میزان رشد آنها مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی میزان رشد قارچها از وزن خشک آنها بعنوان شاخص رشد استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که وزن خشک ایزوله‌های مختلف بین حدود ۲۵ تا ۹۰ میلی‌گرم می‌باشد که دلالت بر رشد تمام ایزوله‌ها در محیط کشت PZ دارد. مقایسه میزان وزن خشک ایزوله‌های F47،F23،F18،F15 (با میزان فعالیت آنزیم زیاد) و ایزوله‌های F21 و F58 (با میزان فعالیت آنزیمی کم) نشان داد که تفاوت محسوسی در میزان وزن خشک آنها وجود ندارد. بنابراین نتایج فوق نشان میدهد عدم فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در دو ایزوله F58,F21 مربوط به میزان رشد آنها نبوده زیرا وزن خشک که یکی از شاخصهای رشد میباشد در ایزوله‌های مختلف تفاوت محسوسی ندارد بلکه عدم تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز احتمالاً یکی از خصوصیات ذاتی قارچهای فوق می‌باشد.

جدول ۱ - محل جمع‌آوری ایزوله‌های مختلف *F. oxysporum*

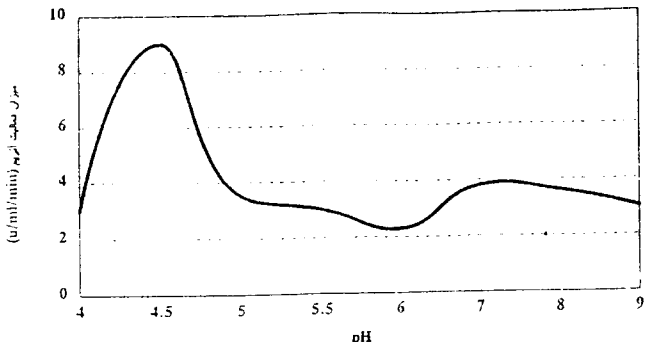
محل جمع آوری	کدنمونه	محل جمع آوری	کدنمونه
تبریز	F59	ایلام	F24
کرمانشاه	F30	ایلام	F25
کرمانشاه	F31	ایلام	F26
کرمان	F53	ارومیه	F15
لرستان	F45	ارومیه	F18
لرستان	F47	ارومیه	F21
-----	F23	تبریز	F2
		تبریز	F58

جدول ۲ - میزان فعالیت آنزیم‌پلی گالاکتوروناز در pH مختلف، روزهای متفاوت و در دو حالت به همزدن (S^+-Shaking) و ثابت (S^--Nonshaking)

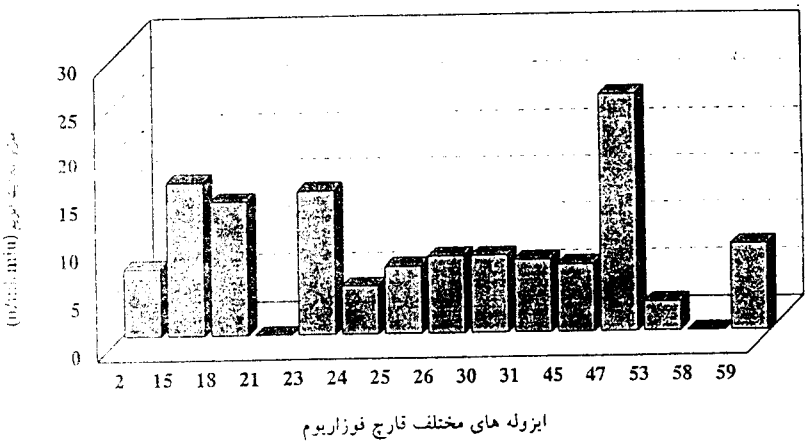
Time(day)										pH
10		8		6		4		2		
S^-	S^+	S^-	S^+	S^-	S^+	S^-	S^+	S^-	S^+	
0.0±0.00	2.3±0.06	0.0±0.00	2.3±0.04	2.3±0.04	2.7±0.05	2.3±0.04	2.5±0.06	0.0±0.00	2.3±0.05	4
0.0±0.00	5.6±0.06	2.0±0.02	7.9±0.07	2.1±0.02	8.8±0.09	2.1±0.02	3.5±0.07	0.0±0.00	0.0±0.00	4.5
0.0±0.00	0.0±0.00	1.8±0.01	2.2±0.04	2.6±0.04	3.0±0.03	2.3±0.05	2.3±0.06	2.1±0.04	2.3±0.05	5
0.0±0.00	0.0±0.00	1.8±0.01	2.4±0.03	2.7±0.02	3.0±0.01	2.5±0.02	2.5±0.05	2.1±0.03	2.4±0.04	5.5
0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	2.6±0.03	2.4±0.03	2.6±0.05	2.3±0.04	2.4±0.03	0.0±0.00	6
0.0±0.01	1.6±0.01	2.1±0.02	2.4±0.04	3.0±0.04	3.7±0.06	2.9±0.03	3.3±0.05	0.0±0.00	0.0±0.00	7
0.0±0.00	0.0±0.00	2.2±0.03	2.1±0.02	4.0±0.04	3.3±0.04	5.2±0.05	4.7±0.06	0.0±0.00	0.0±0.00	8
0.0±0.00	0.7±0.01	1.7±0.02	3.0±0.05	2.4±0.04	3.5±0.05	2.1±0.02	3.5±0.06	0.0±0.00	0.0±0.00	9



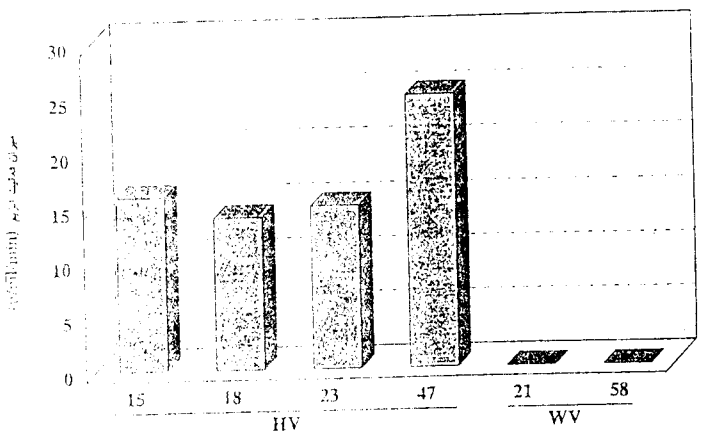
شکل ۳ - میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در روزهای مختلف



شکل ۴ - میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در pHهای متفاوت



شکل ۵ - میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در ایزوله‌های مختلف قارچ *Fusarium oxysporum*



شکل ۶ - میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در ایزوله‌های HV و WV مختلف قارچ *Fusarium oxysporum*

همچنین میزان پروتئینهای مترشحه خارج سلولی ایزوله‌های مختلف به روش برادفورد ۱۹۷۶ (۳) مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش از محیط کشت PZ با pH= ۴/۵ و از بهم‌زن استفاده شد. پس از ٦ روز میزان پروتئینهای ترشح شده در محیط کشت اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله نشان داد میزان پروتئین توسط ایزوله‌های مختلف HV و WV تفاوت محسوسی را نشان نمی‌دهد.

بحث

جهت مطالعه شدت بیماریزایی بعضی قارچها معمولاً از روشهای گلخانه‌ای استفاده می‌گردد (۱۱ و ۱۹) در این تحقیق از روش آزمایشگاهی جهت بررسی شدت بیماریزایی قارچ *F. oxysporum* استفاده گردید. این روش با هزینه و وقت کمتری امکان‌پذیر میباشد.

در این روش میزان صدمات وارده به گیاهچه نخودهای جوانه زده در پلیتهای ۱۵ سانتیمتری مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش ازچهار محیط کشت مختلف استفاده گردید. این محیط‌های کشت، دارای منابع کربن متفاوتی میباشد که بسته به نوع منبع کربن ایزوله‌های قارچ توانایی استفاده از این منابع را بطور متفاوتی از خود نشان می‌دهند. در محیطهای کشت مختلف با توجه به نوع منبع کربن قابل استفاده برای ایزوله‌های قارچ میزان تحریک قارچ جهت تولید آنزیمهای پکتینی و در نتیجه شدت بیماریزایی در ایزوله‌های مختلف متفاوت میباشد (٦ و ۱۲).

عوامل بیماریزای گیاهی مقدار زیادی از آنزیمهایی را که قادر به تخریب ترکیبات ساختمانی دیواره سلولی گیاه هستند تولید می‌کنند. توانایی عوامل بیماریزای گیاهی برای تولید آنزیمهایی که پلی‌ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاه را تجزیه میکنند احتمالاً اولین مرحله در فرآیندهای بیماریزایی میباشد(۱٦). بیشتر از بیست نوع آنزیم تجزیه‌کننده دیواره سلولی تاکنون شناخته شده که بیشترین توجه بر روی آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، پکتین لیاز و پکتات لیاز متمرکز گردیده است(۲ و ۱۸). با توجه به اینکه گزارش شده است توانایی قارچ *F. oxysporum* برای تجزیه تدریجی بافت گیاه مربوط به توانایی آن برای تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز می‌باشد (٦ و ۷ و ۸ و ۱۴)، لذا در این تحقیق میزان تولید و فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در ایزوله‌های مختلف قارچ *F. oxysporum* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که چهار ایزوله F15، F18، F23، F47 (HV) دارای حداکثر فعالیت پلی‌گالاکتوروناز و دو ایزوله F21 و F58(WV) حداقل فعالیت آنزیمی را از خود نشان میدادند. این یافته با گزارشهای ارائه شده در خصوص اهمیت آنزیم مزبور در ایزوله‌های HV قارچ *Rhizctonina solani* مطابقت دارد(۲۳). ضمن اینکه میزان فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در ایزوله‌های مورد مطالعه مؤید دسته‌بندی ایزوله‌های این قارچ توسط آزمایش بیماریزایی انجام شده در این تحقیق می‌باشد.

یکی از نکات قابل بررسی در این نتایج این است که آیا عدم وجود فعالیت آنزیمی در دو ایزوله F21 و F58(WV) از خصوصیات ذاتی آنها بوده یا ناشی از عدم رشد ایزوله‌ها در محیط کشت میباشد. بررسی مطالعه میزان رشد ایزوله‌ها نشان داد که این ایزوله‌ها از نظر رشد با سایر ایزوله‌ها تفاوت محسوسی را نشان نمی‌دهند. بنابراین این نتایج نشان میدهد که عدم فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در دو ایزوله F21 و F58 مربوط به میزان رشد آنها نبوده بلکه احتمالاً یکی از خصوصیات ذاتی ایزوله‌های مزبور می‌باشد.

بررسی و مطالعه تولید و ترشح پروتئینها نشان داد که تفاوت محسوسی در میزان تولید این پروتئینها در ایزوله‌های مختلف وجود ندارد، از طرف دیگر فعالیت آنزیمی پلی‌گالاکتوروناز در ایزوله‌های HV و WV دارای تفاوت زیادی می‌باشد. بنابراین ایزوله‌های WV پروتئینهای ترشحی تولید نموده ولی این پروتئینها فعالیت آنزیمی پلی‌گالاکتوروناز از خود نشان نمی‌دهند.

در مجموع نتایج بدست آمده در این تحقیق از آزمایش بیماریزایی و بررسی فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز مربوط به ایزوله‌های مختلف قارچ *F. oxysporum* دسته‌بندی نسبتاً مشخصی از پانزده ایزوله مورد مطالعه را ارائه داد. بنحویکه چهار ایزوله F15,F18,F23 و F47 بعنوان HV و دو ایزوله F21 و F58 بعنوان WV شناسایی شدند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی بخاطر تأمین بخشی از هزینه‌های اجرائی طرح تشکر میگردد. از

آقای دکتر همایون افشاری آزاد (مؤسسه آفات و بیماریهای گیاهی، بخش تحقیقات بیماریهای گیاهی) برای در اختیار گذاشتن ایزوله‌های قارچ و همچنین از آقای مهندس حسن یونسی کارشناس مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه تشکر و قدردانی میگردد.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ - افشاری آزاد، ه ۱۳۷۷. شناسایی عوامل قارچی بیماری زردی نخود درایران. سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج.

2. Blais P., PA. Rogers, & PM. Charest. 1992. Kinetic of the production of polygalacturonase and pectin lyase by two closely related formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Experimental Mycology 16: 1-7.
3. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindig. Annula of Biochemistry 72: 248.
4. Collmer A. 1987. Pectic enzymes and bacterial invasion of plants. In Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives. MacMillan, New York
5. Cooper R. 1983. The mechanisms and significance of enzymic degradtion of host cell walls by parasites. In: Biochemical Plant Pathology.
6. Di- Pietro A. & MIG Roncero. 1996. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, purification, characterization, and production during infection on Tomato plants. Phytopathology 86: 1324-1330.
7. Di- Pietro A. & MIG Roncero. 1996. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the Tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mycrobiology letters-FEMS 145: 295-299.
8. Di- Pietro A. & MIG Roncero. 1998. Cloning, experssion, and role in pathogenicity of pgl encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Microbe Interactions, MPMI 11: 91-98.
9. Dullemans A., MG. Korsman, PM. Houterman, & J. Keijer. 1995. *In vitro* analysis of infection specificity of *Rhizoctonia solani*. International Symposium of Rhizoctonia. The Netherlands.
10. Gacto M., JV. Soler, & C. Pardo. 1992. Production and characterization of pectic enzymes from yeasts. In: Profiles on Biotechnology. Servicio de Publications, Universidade de Santiago, Santiago.
11. Jan H. & MV. Wiese. 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting in the Palous. Plant Disease 75: 904-906.
12. Mehta A., S. Chopra, V. Kare, & P. Mehta. 1992. Influence of native carbon sources of the production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme*. Zentrablatt-Fuer-mikrobiologie 147: 557-561.
13. Miyairi K., J. Magata, E. Takeda, T. Okuno & K. Sawai. 1990. Purification and properties of pectolytic enzymes produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lagenariae*. Bulletin of the Faculty of

Agriculture Hirosaki University 52: 1-18.

14. Patino B., ML Posada, MT Gonzalez-Jaen & C. Vazquez. 1997. The course of pectin degradation by polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici.* Microbios 91: 47-54.
15. Petrini O. & GB. Ouellette. 1994. Host wall alterations by parasitic fungi. APS Press St. Paul, Minnesota, USA.
16. Rodriguez-Palenzuela P., TJ. Bunr, & A. Collmer. 1991. Polygalacturonase is a virulence factor in *Aspergillus tumefaciens* biovar 3. Journal of Bacterilogy 173: 6547-6552.
17. Schafer W. 1994. Molecular mechanisem of fungal pathogenicity to plants. Annual Review of Phytopathology 32: 461-477.
18. Schell MA., DP. Roberts, & TP. Denny. 1988. Analysis of *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pgl* A and its involvement in phytopathogenicity. Journal Bacteriology 170: 4501-4508.
19. Singh G. 1990. Identification and designation of physiologic races of *Ascochyta rabiei* in India. Indian Phytopathology 1: 48-52.
20. Seewtingham MW., RH. Cruickshank, & DH Wong. 1986. Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of the ceratobasidiaceae. Transactions of the British Myxological Society 86: 305-311.
21. Szecsi A. 1990. Analysis of pectic enzyme zymogram of fusarium species 2 comparison of polygalacturonase zymograms of *Fusarium culmorum* and *Fusarium gramicerum.* Journal of Phytopathology 130: 188-196.
22. Yang H. 1993. Genetic studies on strains of *Rhizoctonia solani* associated with bare patch disease of cereal in Western Australia., PhD. Thesis, University of Western Australia, pp. 119.
23. Zamani MR. 1995. The pectic enzymes of *Rhizoctinia solani* AG-8 strains School of Biological and Enviromental Sciences, PhD. Thesis. Murdoch University, W-Australia, pp. 123.

A Study of Polygalacturonase Activity in Different Iranian Isolates of Fusarium Oxysporum

M. R. ZAMANI , M. MOTALLEBI, AND M.A. AREFPOUR TORABI

Assistant Professors and Former Graduate Student, Department of Biology , Faculty of Sciences , Univesity of Razi, Kermanshah, Iran.

Accepted Feb. 16, 2000

SUMMARY

In this study a rapid and simple method for pathogenicity test of *Fusarium oxysporum* was developed. Four culture media were selected "Pectin Zymogram, Water Agar, Potato Dextrose Agar, and Czapek-Dox". The media were inoculated with a three-day old growing fungi. The cultures were incubated at 25 $\mathring{C}$ for five days. The persentage of necrosis to seedlings was measured at 24 hour intervals. Virulence forms were designated according to spectrum of disease reactions, induced by each isolate, on the seedling. Isolates inducing more than 45% and less than 25% necrosis to seedling were distinguished as highly virulent (HV) and weakly virulent (WV), respectively. On the basis of these findings 4 isolates (F15, F18, F23, and F47) were shown to be HV and 2 isolates (F21 and F58) WV. Production of polygalacturonase, amount of proteins, and dry weight of different HV and WV isolates were compared. The results indicated that there was no significant difference between the amount of proteins and dry weights of these two groups, but polygalacturonase enzyme showed higher activity in HV as compared with WV isolates.

Key words: *Fusarium*, Polygalacturonase, Pectic enzymes, Phatogenicity