اثر مهاری پروتئین‌های مهارکننده پلی گالاکتوروناز لوبیا بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های بیماری‌زای *Fusarium oxysporum* و *Ascochyta rabiei* گیاه نخود

اباصلت حسین زاده کلاگر[۱]، علی مصطفایی[۲]، مصطفی مطلبی[۳] و محمدرضا زمانی[۳]

چکیده

قارچ‌های بیماری‌زا به منظور نفوذ به بافت گیاهی از آنزیم‌های پلی گالاکتورونازی استفاده می‌کنند. در مقابل، برخی از گیاهان واجد پروتئین‌های مهار کننده پلی گالاکتوروناز (Polygalacturonase-Inhibiting Proteins/ PGIP) می‌باشند که عملکرد این گلیکو پروتئین‌ها به تأخیر انداختن نفوذ هیف آن و در نتیجه عدم کلونیزاسیون قارچی می‌باشد. در این تحقیق PGIP از هیپوکتیل واریته‌های درخشان و ناز لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) استخراج شد. سپس به روش کروماتوگرافی جذبی با استفاده از آنزیم پلی گالاکتوروناز به‌عنوان لیگاند اختصاصی، تخلیص گردید. خلوص محصول با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که حاوی سه باند پروتئینی در محدوده ۴۷-۴۵ کیلو دالتونی بود. نتایج خالص‌سازی نشان داد که محصول به‌دست آمده از کرماتوگرافی جذبی از خلوص نسبتاً بالایی برخوردار می‌باشد. هم‌چنین بازده خالص‌سازی PGIP با استفاده از کروماتوگرافی جذبی به میزان ۱/۶۸ میلی‌گرم PGIP به ازای ۱۰۰ گرم هیپوکتیل تازه لوبیا می‌باشد. اثر مهاری پروتئین‌های تخلیص شده بر آنزیم پلی گالاکتوروناز جدایه‌های بیماری‌زای *Fusarium oxysporum* (جدایه F15) و *Ascochyta rabiei* (جدایه IK04) بررسی شد. پروتئین‌های استخراج شده از هیپوکتیل واریته‌های ناز و درخشان قبل از خالص‌سازی به ترتیب معادل ۱۸ و ۲۸ واحد فعالیت مهار کنندگی بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Fusarium oxysporum* از خود نشان می‌دادند در صورتی‌که این میزان مهار کنندگی پس از خالص‌سازی ، هر کدام به ۴۰ واحد افزایش یافت. هم‌چنین فعالیت مهار کنندگی PGIP از این دو واریته بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Ascochyta rabiei* قبل از خالص‌سازی هر کدام به میزان ۹ واحد بوده و پس از خالص‌سازی این میزان مهار کنندگی به ترتیب به ۱۸ و ۲۹ واحد افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین مهارکننده آنزیم پلی گالاکتوروناز، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، کروماتوگرافی جذبی، *Ascochyta rabiei* ، *Fusarium oxysporum*

مقدمه

دیواره سلول گیاهی با داشتن ساختار پایدار، اولین سد دفاعی در مقابل پاتوژن‌ها است. از میان ترکیبات سازنده این دیواره ، پلی ساکاریدهای پکتینی جزء مهم دیواره اولیه دولپه‌ای‌ها (۱۳، ۱۸ و۲۲) و برخی از تک لپه‌ای‌ها (۱۷) می‌باشد در حالی‌که بخش عمده‌ای از لایه میانی را نیز تشکیل می‌دهند. برخی از

۱. دانشجوی سابق دکتری بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه و در حال حاضر استادیار بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران، بابلسر
۲. دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۳. استادان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]

عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله قارچ‌ها بسته به پتانسیل آنزیمی قادر به تخریب این سد دفاعی هستند. کالمر و کن (۱۰) و بعدا آلجی سی و فیورون (۳) گزارش داده‌اند که پکتینازها جزء اولین آنزیم‌هایی هستند که توسط عوامل بیماری‌زای قارچی جهت نفوذ به سلول گیاهی ترشح می‌شوند. اهمیت این آنزیم‌ها در بیماری‌زایی قارچ‌ها با استفاده از مهارکننده‌های پکتینازی در دیواره سلولی برخی از گیاهان به اثبات رسیده است (۱۹). از میان پکتینازها، پلی گالاکتوروناز (Polygalacturonase /PG)، نقش مهمی در تجزیه دیواره سلول گیاهی دارند. نقش PG به عنوان فاکتور اصلی در آسیب به میزبان‌های گیاهی در بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زا از جمله قارچ *Aspergillus flavus* (۳۹)، *Botrytis cinerea* (۴۱)، *Ralstonia solanacearum* (۲۳) *Fusarium oxysporum* (۴۴) و *Ascochyta rabiei* (۳۱) گزارش شده است. این آنزیم‌ها توسط پاتوژن روی بافت میزبان ترشح می‌شوند. در این صورت با آزاد نمودن قطعات اولیگوگالاکتورونیدی (Oligogalacturonide) ضمن این‌که منبع کربنی لازم برای قارچ فراهم می‌شود، نفوذ و کلونیزاسیون پاتوژن قارچی نیز تسهیل می‌گردد (۳۸).

پروتئین‌های مهار کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز (Polygalacturonase-inhibiting proteins/ PGIP) در به تأخیر انداختن پیشرفت هیف قارچی، کاهش پوسیدگی بافت میزبان، تحریک دیگر پاسخ‌های دفاعی گیاه و در نهایت توقف کلونیزاسیون قارچی نقش دارند (۱۴،۱۵ و۲۲). این مهار کننده‌ها مولکول‌های گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۵۵-۴۰ کیلودالتون می‌باشند که به ماتریکس خارج سلولی گیاه با پیوندهای یونی متصل شده‌اند (۲۵ و۳۷). این مهار کننده‌ها تمایل شدیدی به آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچی در مقایسه با آنزیم پلی گالاکتورونازهای باکتریای و یا درونزا دارند (۱ و ۲۴). از مشخصه بارز ساختاری این پروتئین‌ها وجود توالی غنی از لوسین (leucine-rich repeat/ LRR) می‌باشد که احتمالاً در برهم کنش پروتئین‌ها (Protein-protein interaction) نقش دارند (۱۷، ۲۱ و۳۴). ژن‌های کد کننده PGIP به‌صورت خانواده ژنی سازمان دهی شده‌اند. اعضای مختلف هر خانواده ممکن است پروتئین‌هایی با صفات تقریباً مشابه کد کنند اما ویژگی و بافت هدف یا زمان بیان آنها احتمالاً متفاوت است (۱۵ و ۲۰).

تا کنون محققین زیادی اثر مهاری PGIP خالص شده از بخش‌های مختلف لوبیا از جمله غلاف را روی PG قارچ‌های *Aspergillus niger*، *Botryis. Cinerea* و *Fusarium moniliforme* (۱۶و۳۶) و PGIP استخراج شده از هیپوکتیل را بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های *Colletotrichum lindemuthianum* و *Fusarium oxysporum* (۲)، *Colletotrichum lagenarium* و *Fusarium moniliforme* (۲۷)، *Aspergillus niger* و *Fusarium moniliforme* (۷و۸) ، *Colletotrichum lindemuthianum* PG1، *Aspergillus japonicum* و *Aspergillus japonicum* PG2 (۹)، *Stenocarpella maydis* و *Aspergillus niger* گزارش نموده‌اند (۴).

با توجه به اهمیت PGIP لوبیا در ایجاد مقاومت علیه عوامل بیماری‌زای قارچی، در این تحقیق ابتدا PGIP از هیپوکتیل واریته‌های ناز و درخشان گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) استخراج و با استفاده از کروماتوگرافی جذبی خالص‌سازی شد و اثر مهاری آنها بر آنزیم پلی گالاکتوروناز پاتوژن‌های *Fusarium oxysporum* (عامل مولد زردی نخود) و *Ascochyta rabiei* (عامل مولد برق زدگی نخود) و نیز آنزیم پلی گالاکتوروناز تجاری تهیه شده از قارچ *Aspergillus niger* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

واریته‌های لوبیا

بذر واریته‌های ناز و درخشان گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید.

جدایه‌های قارچ و شرایط رشد

جدایه‌های F15 قارچ *Fusarium oxysporum* و IK04 قارچ *Ascochyta rabiei* از پاتوارهای بومی مزارع نخود ایران با

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]

شدت بیماری زایی زیاد (highly virulent) تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند (۳۱ و ۴۴). این جدایه‌ها به‌ترتیب روی گندم در دمای اپتیمم ۲± ۲۲ درجه سانتی‌گراد و محیط آگار سیب زمینی ـ دکستروز (PDA) ۳۹ گرم در لیتر در دمای اپتیمم ۲± ۲۰ درجه سانتی‌گراد رشد داده شده و در۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۳۱ و۴۴).

آنزیم PG *Aspergillus niger* از شرکت سیگما تهیه شد. قبل از استفاده، مقدار کافی از این آنزیم در بافرA حل و جهت حذف نمک و گلیسرول دیالیز گردید.

استخراج آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز

برای فراهم نمودن شرایط مناسب جهت تولید آنزیم‌های پکتینازی توسط جدایه‌های F15 و IK04 از محیط کشت زایموگرم (Pectic Zymogram medium / PZ pH=4.5) که شامل ده گرم پکتین سیب (فلوکا)، ۲/۶۴ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۳۴ گرم فسفات دی پتاسیم هیدروژن و ۰/۱۴ گرم سولفات منیزیم (۷ ملکول آب) در حجم نهایی یک لیتر آب مقطر با ۴/۵ pH استفاده گردید (۴۰). جدایه‌ها در ارلن‌های نیم لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط PZ به مدت ۱۰روز (برای F15) و ۷ روز (برای IK04) در دمای اپتیمم ذکر شده و در ۲۵۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. سپس آنزیم‌های پکتینازی با استفاده از متد برجر و همکاران (۴) با اندکی تغییرات استخراج گردید. به این نحو که محیط مایع بعد از کشت با فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر (Millipore, USA) صاف شد و جهت حذف پکتین بعد از رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۸۵ درصد اشباع، رسوب در بافر سدیم استات ۲۰ میلی‌مولار با pH = ۵ (بافر A) حل گردید و در مقابل این بافر دیالیز گردید. محلول حاصل به عنوان محلول حاوی آنزیم پلی گالاکتوروناز مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز (PG)

فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز با اندازه‌گیری محصولات قندی احیا شده در مخلوط واکنش با روش کالمر و همکاران (۱۱) همراه با تغییراتی به‌شرح زیر اندازه‌گیری گردید. بدین منظور ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی به ۲۱۰ میکرولیتر از سوبسترای ۰/۲۴ درصد (w/v) پلی گالاکتورونیک اسید با pH = ۵/۳ (محلول در۰/۱۲ مولار کلرید سدیم، ۶۰ میلی‌مولار استات سدیم و ۶ میلی‌مولار اتانل دی آمین تترا استیک اسید) اضافه شد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از متوقف نمودن واکنش با استفاده از معرف مس و حرارت، جذب نوری محلول سانتریفیوژ شده که حاوی گروه‌های احیایی در حضور معرف آرسنو مولیبدات می‌باشد در طول موج ۵۰۰ نانومتر (اسپکتروفتومتر شیماتزو مدل UV-) 1201 خوانده شد. در این روش از محلول مونومری D–گالاکتورونیک اسید با غلظت‌های مختلف به‌عنوان استاندارد استفاده شد. بنابه تعریف، یک واحد آنزیم پلی گالاکتوروناز مقدار آنزیمی است که یک میکرومول از D–گالاکتورونیک اسید (گروه‌های احیایی) را در مدت یک دقیقه تحت این شرایط تولید نماید (۱۱).

شرایط کاشت واریته‌های لوبیا و استخراج پروتئین‌های گیاهی

بذرها پس از ضد عفونی با آب ژاول۰/۰۵ درصد ، در خاک سترون شده و در دوره نوری ۱۵ ساعته (با دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد) و تاریکی (با دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد) براساس روش سرونی و همکاران (۷) کشت شدند. سپس بر اساس روش برگمن و همکاران (۵) دو روز قبل از برداشت، گیاهان با سدیم سالیسیلات ۵۰ میلی‌مولار روزانه اسپری شدند و سه تا شش ساعت قبل از برداشت نیز بافت هیپوکتیل آنها زخمی شدند. هیپوکتیل‌ها بعد از برداشت و شستشو با آب مقطر استریل، به قطعات کوچک بریده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای۶۰- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۰۱ اتمسفر لیوفلیزه شدند.

استخراج PGIP از هیپوکوتیل ده روزه واریته‌های ناز و درخشان لوبیا به روش ترکیبی سرونی و همکاران (۷) و فیورون (۱۹) همراه با اندکی تغییر انجام گرفت. سه گرم از پودر لیوفلیزه شده در۲۵ میلی‌لیتر از بافر کم نمک

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]

(low-salt buffer/LSB) که شامل ۵۰ میلی‌مولار سدیم استات با pH= ۵ ، ۳ میلی‌مولار اتانل دی آمین تترا استیک اسید، ۱ میلی‌مولار دی تیوتریتول و گلیسرول ۱۰ درصد بود، حل شد و به مدت حداقل نیم ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس در g ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به ظرف تمیز منتقل گردید و رسوب به منظور استخراج مجدد در ۱۵ میلی‌لیتر از بافر با نمک بالا (high- / 1M NaCl + LSB salt buffer) حل شد و به مدت حداقل نیم ساعت (ترجیحا در طول شب) در ۴ درجه سانتی‌گراد روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس مجددا در همان شرایط سانتریفیوژ شد و فاز رویی به ظرف قبلی اضافه گردید. محلول جمع آوری شده به منظور کدورت زدایی در g ۱۵۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس با سولفات آمونیوم در غلظت نهایی ۸۵ درصد اشباع رسوب دهی شد. رسوب در ۵ میلی‌لیتر از بافرA حل و یک شب در مقابل این بافر دیالیز شد و بعد از افزودن PMSF (penylmethyl sulfnyl flouride) تا غلظت نهایی یک میلی‌مولار برای مرحله بعد در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید.

کروماتوگرافی جذبی

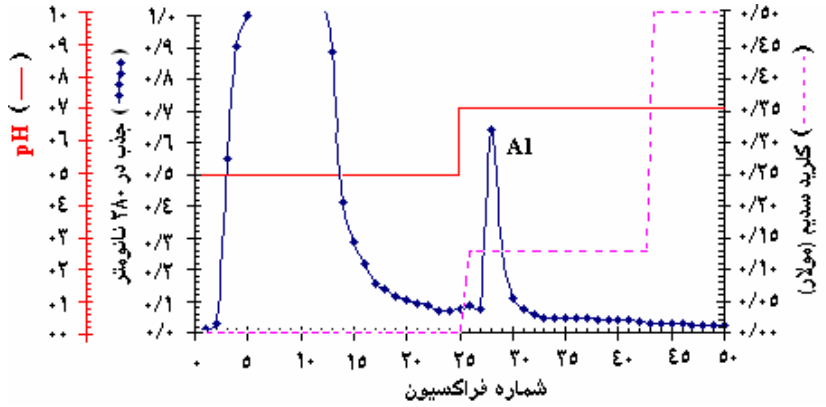
کروماتوگرافی جذبی براساس دستورالعمل فارماسیا انجام شد. دو گرم رزین خشک Sepharose 4B فعال شده با سیانوژن بromید (فارماسیا) در ۴۰۰ میلی‌لیتر از محلول یک میلی‌مولار اسید کلریدریک به تعلیق در آمد و ۱۵ دقیقه در این محلول نگه‌داری شد تا متورم گردید. پس از سانتریفیوژ با دور کم، ژل رسوب داده شد و مایع رویی دور ریخته شد. ژل متورم شده به یک بشر ۴۰ میلی‌لیتر منتقل شد و به آن ۱۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار کربنات هیدروژن سدیم با pH = ۸/۳ که حاوی نیم مولار کلرید سدیم و ۵۰ میلی‌گرم لیگاند PG قارچ *A. niger* (Sigma) بود اضافه شد و ۲/۵ ساعت در دمای اتاق به آرامی تکان داده شد. سپس گروه‌های فعال باقی مانده ژل با افزودن دو حجم از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار تریس ـ کلر با pH = ۸ به مدت ۲-۳ ساعت مسدود گردید. ژل آماده شده به ستون دست ساز با قطر ۰/۹۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۹ سانتی‌متر منتقل شد. ستون ۵ بار به‌طور متناوب هر بار با ۵ حجم ستون از بافرهای ۱۰۰ میلی‌مولار استات سدیم با pH = ۸ و ۱۰۰ میلی‌مولار تریس- کلر با pH = ۸ که واجد نیم مولار کلرید سدیم بودند، شستشو داده شد. سپس با بافر A به تعادل رسید. نمونه‌های پروتئینی با غلظت ۲/۷۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر A با سرعت ۱۸ میلی‌لیتر بر ساعت وارد ستون گردید. سپس ستون با بافر A مجددا شستشو داده شد تا جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر به کمتر از ۰/۰۱ رسید. برای جداشدن پروتئین‌های متصل به بستر، ابتدا از بافر A واجد ۰/۱۳ مولار کلرید سدیم تا رسیدن خروجی ستون به کمتر از ۰/۰۱ و سپس از بافرPBS حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم با pH = ۷/۲ براساس گزارش برجر و همکاران (۴) استفاده شد. کلیه فراکسیون‌ها در حجم‌های ۳ میلی‌لیتری جمع آوری و جذب آنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت مهاری PGIP

میزان فعالیت PGIP براساس کاهش گروه‌های احیا شده توسط آنزیم پلی گالاکتورونناز به روش کلمر و همکاران و در pH = ۵-۵/۳ مورد بررسی گرفت(۱۱). برای اندازه‌گیری فعالیت مهاری PGIP ، ۴۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل۱۰ میکرولیتر از آنزیم، ۳۰ میکرولیتر از PGIP در بافر A تهیه گردید. بعد از ۲۰ دقیقه قرار دادن مخلوط واکنش در دمای اتاق،۲۱۰ میکرولیتر سوبسترای ۰/۲۴ درصد(w/v) پلی گالاکتورونیک اسید pH = ۵/۳ اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اینکوبه گردید. واکنش با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر معرف مس و نیز قرار دادن در حمام آب جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. بعد از سرد شدن، ۵۰۰ میکرولیتر معرف آرسنو مولیبدات به مخلوط اضافه گردید و گروه‌های احیا شده در طول موج ۵۰۰ نانومتر مورد سنجش.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]



شکل ۱ . کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی جذبی با استفاده از ستون سفارز ۴ B حاوی لیگاند آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. niger*

قرار گرفت نمونه کنترل در این گونه از آزمایش‌های محلول‌های PG و PGIP هستند که به مدت یک ساعت جوشانده شدند. بنا به تعریف یک واحد PGIP مقدارمهار کننده لازم برای کاهش ۵۰ درصد فعالیت یک واحد آنزیم پلی گالاکتوروناز تحت این شرایط است.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد (۶) انجام گرفت. در این روش از آلبومین سرم گاوی (Sigma, BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد.

شرایط SDS-PAGE و رنگ آمیزی

الکتروفورز در ژل پلی آکریلامید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) به روش لاملی (۲۶) در ژل جداکننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد صورت گرفت. بعد از الکتروفورز، ژل به روش کوماسی آبی (۴۳) یا نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. رنگ آمیزی نقره اسیدی براساس روش موریسی (۳۰) انجام گرفت.

نتایج

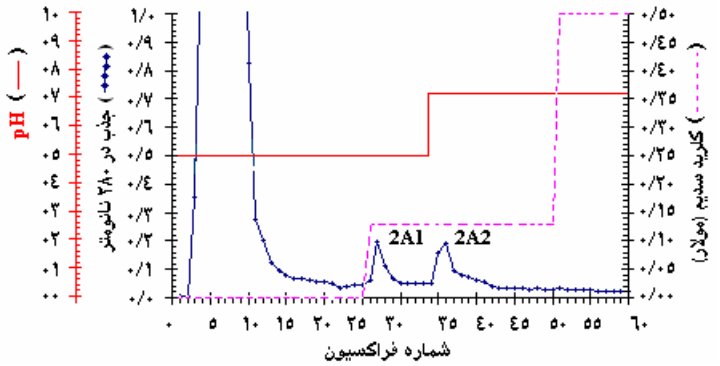
با توجه به این‌که پروتئین‌های مهار کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز (PGIP) تمایل شدیدی جهت اتصال به آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچی (آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی گیاهان و موثر در بیماری‌زایی قارچ‌ها) و مهار فعالیت آنها دارند، لذا جهت دستیابی به فرم خالص این گلیکوپروتئین‌ها برای بررسی و مطالعه اثر مهار کنندگی آنها بر میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* و *A. rabiei* در گیاه نخود، در این تحقیق اقدام به خالص‌سازی PGIP در واریته‌های ناز و درخشان از گیاه لوبیا گردید.

جداسازی PGIP با استفاده از کروماتوگرافی جذبی

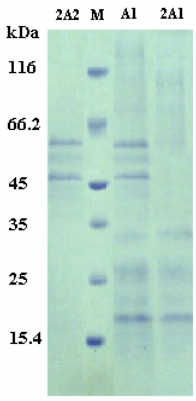
جهت خالص‌سازی PGIP از پروتئین‌های استخراج شده از هیپوکتیل واریته‌های ناز و درخشان گیاه لوبیا مقدار ۷۰/۷۲ میلی‌گرم پروتئین استخراج شده به ستون Sepharose 4B اضافه گردید. در کروماتوگرافی جذبی که در ستون Sepharose 4B حاوی لیگاند آنزیم پلی گالاکتوروناز انجام گرفت، بخش عمده‌ای از محتوی پروتئینی (فراکسیون‌های ۲ الی ۱۵) عصاره استخراج شده هیپوکتیل که فاقد فعالیت مهاری بود بدون تمایل به ستون و با شستشو توسط بافر با pH = ۵ از آن خارج گردید (شکل ۱). پس از این‌که جذب خروجی ستون به کمتر از ۰/۰۱ رسید، پروتئین‌های متصل شده به ستون طی دو روش از آن خارج شدند. روش اول توسط افزایش pH و قدرت یونی بافر به‌طور هم‌زمان براساس متد پیشنهادی برجر و همکاران (۴) صورت گرفت. بدین صورت که ستون با بافر PBS (حاوی کلرید سدیم ۰/۱۳ مولار) با pH = ۷/۲ شستشو شد و در پایان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]



شکل ۲ . کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی جذبی با استفاده از ستون سفارز B ۴ حاوی لیگاند آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. niger*



شکل ۳ . SDS-PAGE پروتئین‌های متصل به ستون جذبی که با استفاده از تغییر pH و قدرت یونی به‌طور هم‌زمان (محصول قله A1 شکل ۱) و روش دو مرحله‌ای (محصول قله‌های 2A1 و 2A2 شکل ۲) جدا شده‌اند. M = مارکر پروتئینی

برای اطمینان کامل از جدا کردن تمامی پروتئین‌های متصل شده به ستون، جریان بافرPBS حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم با ۷/۲ = pH برقرار گردید. نتایج حاصله نشان داد که از فراکسیون‌های ۲۷ الی ۳۰ حاوی پروتئین بودند (قله A1 شکل ۱). جهت استحصال پروتئین، این فراکسیون‌ها مخلوط و با عمل دیالیز نمک زدایی گردید. مطالعه مهار کنندگی پروتئین‌های به‌دست آمده نشان داد که این پروتئین‌ها دارای فعالیت مهار کنندگی می‌باشند. نتایج SDS-PAGE نشان داد که محتوی قله A1 حاوی سه باند پروتئینی در محدوده ۵۵-۴۷ کیلودالتون و چند باند در محدوده باندی ۱۵ تا ۳۳ کیلودالتون می‌باشد (شکل ۳).

در روش دوم پس از شستشوی ستون توسط بافرA با pH=۵ و خارج شدن پروتئین‌های متصل نشده به لیگاند (فراکسیون‌های ۲ الی ۱۵، شکل ۲) برای جدا نمودن پروتئین‌های متصل شده به ستون، ابتدا قدرت یونی بافر ، سپس pH آن افزایش یافت. بدین صورت که ابتدا با استفاده از قدرت یونی ۰/۱۳ مولار کلرید سدیم که به بافر A اضافه شد (pH = ۵)، جهت جدا شدن پروتئین‌ها از ستون استفاده شد. سپس توسط بافرPBS حاوی ۰/۱۳ مولار کلرید سدیم با pH = ۷/۲ شستشوی ستون ادامه یافت. در پایان برای اطمینان کامل از جدا کردن تمامی پروتئین‌های متصل شده به ستون، جریان بافرPBS حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم با pH = ۷/۲ برقرار گردید. قسمت عمده پروتئین‌ها در مرحله شستشو توسط بافر با pH= ۵ از ستون خارج گردید (فراکسیون‌های ۲ الی ۱۳) (شکل ۲). این پروتئین‌ها فاقد فعالیت مهار کنندگی بودند. اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های فراکسیون‌های پس از اعمال غلظت نمکی ۰/۱۳ مولار کلرید سدیم (فراکسیون‌های ۲۵ الی ۶۰) نشان داد که فراکسیون‌های ۲۶ الی ۲۹ (قله 2A1) و فراکسیون‌های ۳۴ الی ۳۷ (قله 2A2) حاوی پروتئین می‌باشند (شکل ۲). جهت استحصال پروتئین‌های این دو قله، فراکسیون‌های مربوط به این دو قله به‌طور جداگانه مخلوط گردیدند و پس از رسوب دهی، دیالیز شدند.

نتیجه بررسی فعالیت مهار کنندگی این پروتئین‌ها نشان داد که پروتئین‌های موجود درقله دوم (2A2) واجد فعالیت مهاری می‌باشند. الگوی SDS-PAGE محتویات این قله بیانگر دو باند

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]

جدول ۱ . خلاصه‌ای از مراحل خالص‌سازی PGIP هیپوکوتیل لوبیا با استفاده از کروماتوگرافی جذبی در این جدول نشان داده شده است. فعالیت PGIP براساس میزان مهاری که روی یک واحد از آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A.niger* در روش کالمر دارد می‌باشد.

مرحله خالص‌سازی	حجم (ml)	پروتئین (mg/ml)	پروتئین کل (mg)	فعالیت آنزیمی (U/ml)	فعالیت کل (U)	فعالیت ویژه آنزیمی (U/mg)	درصد محصول	خلوص محصول نهایی
پروتئین استخراج شده	۹۴	۰/۹	۸۴/۴	۲۳/۸	۲۲۴۱/۹	۲۶/۵	۱۰۰	۱
رسوب پروتئین با سولفات آمونیوم سولفات۸۵ درصد اشباع	۲۶	۲/۷	۷۰/۷	۸۶/۱	۲۲۳۹/۳	۳۱	۱۰۰	۱/۱۶
پروتئین خالص شده با کروماتوگرافی جذبی	۰/۹	۰/۹	۰/۸۱	۱۳۴/۸	۱۲۱/۳	۱۴۹/۸	۵/۴	۵/۶

قوی پروتئینی نزدیک به‌هم در محدوده ۵۵–۴۷ کیلودالتونی و یک باند ضعیف تر بین این دو باند می‌باشد (شکل ۳). پروتئین‌های موجود در قله اول (2A1) پروتئین‌هایی با وزن پائین بوده (شکل ۳) و فاقد فعالیت مهار کنندگی می‌باشند.

روش جداسازی PGIP در کروماتوگرافی جذبی نشان داد که این روش می‌تواند میزان فعالیت ویژه PGIP را از U/mg ۲۶/۵ قبل از خالص‌سازی به U/mg ۱۴۹/۸ بعد از خالص‌سازی و به میزان ۵/۶ برابر افزایش دهد (جدول ۱).

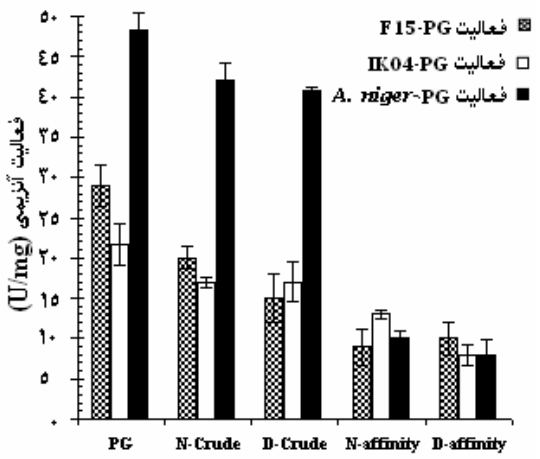
روش خالص‌سازی PGIP در کروماتوگرافی جذبی مورد مطالعه نشان داد که این روش می‌تواند میزان فعالیت ویژه PGIP را از U/mg ۲۶/۵ قبل از خالص‌سازی به U/mg ۱۴۹/۸ بعد از خالص‌سازی به میزان ۵/۶ برابر افزایش دهد (جدول ۱).

با توجه به خالص‌سازی نسبی PGIP در کروماتوگرافی جذبی و به‌دست آوردن یک مجموعه پروتئینی با دارا بودن فعالیت مهار کنندگی آنزیم پلی گالاکتوروناز (قله 2A2 در شکل ۲) در این مرحله فعالیت مهار کنندگی این پروتئین‌ها نسبت به پروتئین‌های استخراج شده از واریته‌های ناز و درخشان (قبل از خالص‌سازی) بر فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های *F. oxysporum*، *A. rabiei* و *A. niger* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (شکل ۴). نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند پروتئین‌های استخراج شده از هیپوکتیل واریته ناز (قبل از خالص‌سازی) معادل ۱۸ واحد فعالیت مهار کنندگی بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *F. oxysporum* از خود نشان می‌دهند در حالی‌که پس از خالص‌سازی با روش جذبی این میزان مهار کنندگی تا ۴۰ واحد افزایش یافته است. فعالیت مهار کنندگی پروتئین‌های استخراج شده از واریته درخشان (قبل از خالص‌سازی) بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *F. oxysporum* معادل ۲۸ واحد بوده در صورتی‌که این میزان مهار کنندگی پس از خالص‌سازی PGIP به ۴۰ واحد می‌رسد (شکل ۴). همین بررسی در مورد مهار کنندگی PGIP این دو واریته (ناز و درخشان) بر میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. rabiei* نشان می‌دهد که فرم ناخالص PGIP استخراج شده از هیپوکتیل واریته ناز به میزان ۹ واحد فعالیت مهار کنندگی از خود نشان می‌دهد در صورتی‌که پس از خالص‌سازی این میزان مهار کنندگی به ۱۸ واحد افزایش می‌یابد. میزان مهار کنندگی PGIP واریته درخشان قبل از خالص‌سازی ۹ واحد بوده و پس از خالص‌سازی به ۲۹ واحد افزایش می‌یابد (شکل ۴).

هم‌چنین در این مطالعه از آنزیم پلی گالاکتوروناز خالص شده تجاری تهیه شده از قارچ *A. niger* جهت بررسی میزان مهار کنندگی PGIP این دو واریته استفاده گردید. نتایج حاصله نشان داد که PGIP واریته ناز قبل از خالص‌سازی به میزان ۱۳ واحد فعالیت مهار کنندگی از خود نشان می‌دهد در صورتی‌که پس از خالص‌سازی این میزان به ۷۷ واحد افزایش می‌یابد. نتایج مشابهی در مورد میزان مهار کنندگی PGIP واریته

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]



شکل ۴ . کاهش فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در میانکنش با PGIP برای محاسبه میزان فعالیت مهاری PGIP ، از میزان کاهش فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز استفاده شده است. به‌طوری‌که هر واحد فعالیت PGIP برابر کاهش ۵۰ درصد از فعالیت یک واحد از آنزیم پلی گالاکتوروناز می‌باشد.

PGIP = N-crude استخراج شده از هیپوکتیل واریته ناز قبل از خالص‌سازی

PGIP = D- crude استخراج شده از هیپوکتیل واریته درخشان قبل از خالص‌سازی

PGIP = N- affinity استخراج شده از هیپوکتیل واریته ناز بعد از خالص‌سازی

PGIP = D- affinity استخراج شده از هیپوکتیل واریته درخشان بعد از خالص‌سازی

درخشان بر فعالیت این آنزیم مشاهده گردید که در آن میزان مهار کنندگی فرم ناخالص PGIP برابر ۱۶ واحد بوده و پس از خالص‌سازی به ۸۰ واحد افزایش می‌یابد (شکل ۴).

مقایسه میزان مهار کنندگی PGIP قبل و بعد از خالص‌سازی در دو واریته ناز و درخشان بر فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز سه قارچ *F. oxysporum*، *A. rabiei* و *A. niger* نشان می‌دهد که پروتئین‌های خالص شده در روش کروماتوگرافی جذبی استفاده شده در این تحقیق دارای فعالیت مهار کنندگی آنزیم پلی گالاکتوروناز می‌باشند. هم‌چنین این نتایج نشان می‌دهند که این روش خالص‌سازی طی یک مرحله قادر به خالص نمودن نسبی PGIP از هیپوکتیل گیاه لوبیا می‌باشد.

بحث

ژن‌های دخیل در مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان بعد از تماس گیاه با یک عامل زنده و یا غیر زنده فعال می‌شوند (۳۳). از جمله ژن‌های موثر در مقاومت گیاهان، ژن‌های تولید کننده پروتئین‌های مهار کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز (PGIP) می‌باشند که با مهار کردن فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچی مانع کلونیزاسیون قارچ بیماری‌زا می‌شوند (۱۴ و ۱۵).

این پروتئین‌ها در گیاهان دارای توانایی تشخیص و مهار اختصاصی متنوع بوده به‌طوری‌که PGIPهای استخراج شده از یک بافت نیز قدرت ممانعتی متفاوتی از خود نشان می‌دهند به عنوان مثال بیش از ۲۰ ایزوفرم PGIP که در برگ‌های تره (*Allium porrum* L.) یافت شده‌اند هر کدام دارای اثر مهاری متفاوتی می‌باشند(۱۹ و ۳۸). گزارش‌ها نشان می‌دهند PGIPهایی که از لحاظ خواص بیوشیمیایی نیز بسیار نزدیک به هم می‌باشند دارای فنوتیپ مهاری متفاوتی هستند (۱۲ و ۱۶). این موضوع، اهمیت انتخاب PGIPهای مناسب را برای مقابله بهتر با آلودگی قارچی نشان می‌دهد.

در این تحقیق جهت بررسی اثر مهاری PGIP بر فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* و *A. rabiei* از PGIP دو واریته ناز و درخشان لوبیا استفاده گردید.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]

در این مطالعه نشان داده شد که می‌توان از روش کروماتوگرافی جذبی (sepharose 4B) با استفاده از لیگاند آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. niger* برای خالص‌سازی پروتئین‌های مهار کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های مختلف استفاده نمود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که PGIPهای استخراج شده از هیپوکتیل واریته‌های ناز و درخشان لوبیا، قبل و بعد از خالص‌سازی به ترتیب به میزان ۱۰ و ۷۹ درصد از خود فعالیت مهاری بر آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. niger* نشان می‌دهند. از آنجا که لیگاند مورد استفاده جهت این خالص‌سازی آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *A. niger* بوده است نتایج فوق مورد انتظار می‌باشد. در این روش میزان فعالیت ویژه PGIP از ۲۶/۵ U/mg به ۱۴۹/۸ U/mg یعنی به میزان ۵/۶ برابر افزایش می‌یابد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با انتخاب این روش خالص‌سازی می‌توان به مقدار PGIP مناسبی دست یافت. به‌طوری‌که بازده خالص‌سازی PGIP با استفاده از کروماتوگرافی جذبی به میزان ۱/۶۸ میلی‌گرم PGIP به ازای ۱۰۰ گرم هیپوکتیل تازه لوبیا (معادل تقریبی ۵/۶ گرم هیپوکتیل لیوفیلیزه) می‌باشد. مقایسه این نتایج با نتایج گزارش شده توسط برگر و همکاران و سرونی و همکاران نشان می‌دهد که آنها نیز با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی به ترتیب میزان یک و ۱/۳ میلی‌گرم PGIP از همین مقدار هیپوکتیل را خالص نموده‌اند(۴ و ۷).

دوویدیو و همکاران (۱۲) با مطالعه روی ژن pgip ژنوتیپ‌های Pinto و BAT93 در لوبیا نشان دادند که ژن‌های pgip به‌صورت خانواده ژنی در منطقه‌ای به وسعت ۵۰ کیلو جفت باز روی کروموزوم شماره ۱۰ لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) قرار دارند. نتایج ارائه شده در این مطالعه نشان داد که محصولات کروماتوگرافی جذبی (قله 2A2 در شکل ۲) در ژل SDS-PAGE در ناحیه ۵۵-۴۷ کیلو دالتون دارای سه باند نزدیک به هم با فعالیت مهار کنندگی می‌باشند (شکل ۳). با توجه به این‌که غالب PGIPها دارای پتانسیل متفاوتی برای سایت‌های N-گلیکوزیدی می‌باشند (PGIP-1 داری سه سایت (۱۶، ۲۸ و۴۲)، PGIP-2 دارای دو سایت (۲۸ و ۲۹) و PGIP-3 دارای پتانسیل برای سه سایت N-گلیلوزیدی (۴۲)) می‌باشند. بنابراین انتظار می‌رود این ترکیبات دارای وزن مولکولی بیشتری نسبت به محدوده وزنی پیش بینی شده براساس ساختار اولیه شان (بین دو حد کمترین (تقریبا ۳۶/۷۷۳۳ کیلودالتون برایPvPGIP2) و بیشترین (تقریباً ۳۷/۸۰۱۸ کیلودالتون برای PvPGIP3)) باشند (۴ و ۷). نتایج این تحقیق نشان داد که محدوده تقریبی وزنی از ۴۷ تا ۵۵ کیلودالتون برای این گونه از پروتئین‌ها احتمالا به دلیل میزان گلیکوزیله شدن متفاوت در PGIPهای به‌دست آمده باشد.

هم‌چنین در منابع گزارش گردیده است که PGIP موجود در محلول استخراجی هیپوکتیل لوبیا قبل از خالص‌سازی قادر به مهار آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های *Colletotrichum lindemuthianum* و *Sclerotium rolfsii* بوده است در حالی‌که بعد از خالص‌سازی قادر به مهار آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Sclerotium rolfsii* نمی‌باشد (۲). بنابراین انتظار می‌رود که خالص‌سازی این دسته از پروتئین‌ها سبب شود تا فنوتیپ عملکردی متفاوتی از خودشان نشان بدهند. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز نشان می‌دهد که PGIPهای استخراج شده از هیپوکتیل واریته‌های ناز و درخشان لوبیا، قبل و بعد از خالص‌سازی رفتارهای مهاری متفاوتی را بر میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های *F. oxysporum* و *A. rabiei* از خود نشان می‌دهند (شکل ۴).

با توجه به پیش بینی عملکرد اختصاصی PGIPها در مهار فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچی، در این تحقیق نیز عملکرد اختصاصی PGIP استخراج شده از دو واریته ناز و درخشان لوبیا بر فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ‌های *F. oxysporum* و *A. rabiei* نشان داده شد. پاتوژن‌های *Fusarium oxysporum* در ایجاد پوسیدگی آوندی نخود (زردی نخود) و قارچ *Ascochyta rabiei* در ایجاد برق زدگی نخود نقش داشته و خسارت شدیدی به مزارع نخود وارد می‌نمایند (۳۲ و ۳۵). لذا نتایج این تحقیق می‌تواند زمینه ساز مطالعات بیشتر در جهت مدیریت کنترل این دسته از بیماری‌ها با مقاوم سازی این محصولات استراتژیک قرار گیرد.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]

منابع مورد استفاده

1. Abu-Goukh, A.A. and J. M. Labavitch. 1983. The in vivo role of ‘‘Bartlett’’ pear fruit polygalacturonase inhibitors. Physiol. Plant Pathol. 23: 123–135.
2. Albersheim, P. and A.J. Anderson. 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 1815–19
3. Alghisi, P. and F. Favaron. 1995. Pectin degrading enzymes and plant parasite interactions. Eur. J. Plant Pathol. 101: 365–375.
4. Berger, D.K., D. Oelofse, M.S. Arendse, E. Du Plessis and I. A. Dubery. 2000. Bean polygalacturonase inhibitor protein-(PGIP-1) inhibits polygalacturonases from *Stenocarpella maydis*. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 57: 5-14.
5. Bergmann, C.W., Y. Ito, D. Singer, P. Albersheim, A.G. Darvill, N. Benhamou, L. Nuss, G. Salvi, F. Cervone and G. De Lorenzo. 1994. Polygalacturonase-inhibiting protein accumulates in *Phaseolus vulgaris* L. in response to wounding, elicitors and fungal infection. Plant J. 5: 625-634.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254
7. Cervone, F., G. De Lorenzo, L. Degra, G. Salvi and M. Bergami. 1987. Purification and Characterization of a Polygalacturonase-Inhibiting Protein from *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 85: 631-637.
8. Cervone, F., M.G. Hahn, G. De Lorenzo, A. Darvill and P. Albersheim. 1989. Hostpathogen interactions. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. Plant Physiol. 90: 542–48.
9. Cervone, F., G. De Lorenzo, R. Pressey, A. Darvill and P. Albersheim. 1990. Can Phaseolus PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants. Phytochem. 29: 447–449.
10. Collmer, A. and N.T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 24: 383–409.
11. Collmer, A., J.L. Ried and M. S. Mount. 1988. Assay methods for pectic enzymes. Methods in Enzymol.161: 329-335
12. D’Ovidio, R., A. Raiola, C. Capodicasa, A. Devoto, D. Pontiggia, S. Roberti, R. Galletti, E. Conti, D. O’Sullivan and G. De Lorenzo. 2004. Characterization of the Complex Locus of Bean Encoding Polygalacturonase-Inhibiting Proteins Reveals Subfunctionalization for Defense against Fungi and Insects. Plant Physiol. 135: 2424-2435.
13. De Lorenzo, G., F. Cervone, D. Bellicampi, C. Caprari, A.J. Clark, A. Desiderio, A. Devoto, R. Forrest, F. Leckie, L. Nuss and G. Salvi. 1994. Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell–cell communication. Biochem. Sci. Trans. 22:396–399.
14. De Lorenzo, G., R. Castoria, D. Bellincampi and F. Cervone. 1997. Fungal invasion enzymes and their inhibition. PP. 61–83. *In*: Carrol, G. and P. Tudzynski (Eds.), The Mycota. V. Plant Relationships. Part B. Springer Pub., Berlin.
15. De Lorenzo, G., R D. Ovidio and F. Cervone. 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. Annu. Rev Phytopathol. 39: 313-335.
16. Desiderio, A., B. Aracri, F. Leckie, B. Mattei, G. Salvi, H. Tigelaar, J.S.C. Van Roekal, D.C. Baulcombe, L.S. Melchers, G. De Lorenzo and F. Cervone. 1997. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 852–60
17. Dixon, M., D. Jones, J. Keddie, C. Thomas, K. Harison and J. Jones. 1996. The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeats proteins. Cell. 84: 457–459.
18. Favaron, F., R. D’ovidio, E. Porceddu and P. Alghisi.1994.Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. Planta 195: 80–87.
19. Favaron, F. 2001. Gel detection of Allium porrum polygalacturonase-inhibiting protein reveals a high number of isoforms. Physiological and Molecular Plant Pathol. 58: 239-245
20. Ferrari S., D. Vairo, F.M. Ausubel, G.Cervone, G. De Lorenzo. 2003. Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase- inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. Plant Cell . 15: 93-106.
21. Grant, M.R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattier, R.W. Innes and J.L. Dangl. 1995. Structure of the *Arabidopsis* RPM 1 gene enabling dual specificity disease resistance. Sci. 269: 843–845.
22. Hahn, M.G., P. Buchell, F. Cervone, S. H. Doares, R.A. O’Neill, A. Darvill and P. Albersheim. 1989. Roles of cell wall constituents in plant pathogen interactions. PP. 131–181. *In:* E. Nester and T. Kosuge (Eds.), Plant–Microbe Interactions. McGraw-Hill, New York.
23. Huang, Q. and C. Allen. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacereaum* on tomato plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 57: 77–83.
24. Johnston, D.J., V. Ramanathan and B. Williamson. 1993. A protein from immature raspberry fruits which inhibits endopolygalacturonases from *Botrytis cinerea* and other micro-organisms. J. Exp. Bot. 44: 971–976.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]

25. Johnston, D.J., B. Williamson and G.P. Mcmillan. 1994. The interactions in planta of polygalacturonases from Botrytis cinerea with a wall-bound polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in raspberry fruits. J. Exp. Bot. 45: 1837–1843.
26. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4. Nature 227:680-685.
27. Lafitte, C., J. Barthe, J. Montillet and A. Touze. 1984. Glycoprotein inhibitors of Colletotrichum lindemuthianum endopolygalacturonase in near isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* resistant and susceptible to anthracnose. Physiol. Plant Pathol. 25: 39–53.
28. Leckie, F., B. Mattei, C. Capodicasa, A. Hemmings, L. Nuss, B. Aracri, G. De Lorenzo and F. Cervone. 1999. The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed b-strand/b-turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability. European Mol. Biol. Organization (EMBO) J. 18: 2352–2363.
29. Mattei, B., M.S. Bernalda, L. Federici, P. Roepstorff, F. Cervone and A. Boffi. 2001. Secondary structure and posttranslational modifications of the leucine-rich repeat protein PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein) from *Phaseolus vulgaris*. Biochem. 40: 569-576
30. Morrissey, J. H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procerdure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. 117: 307-310
31. Motallebi, M., M.R. Zamani and A. Hosseinzadeh Colagar. 2003. Relationship between polygalacturonase activity and pathogenicity among Iranian isolates of *Ascochyta rabiei*. J. Sci & Technol. Agric & Natur. Resour. 6(4): 159-169
32. Nene, Y.L., and M.V. Reddy. 1987. Chickpea diseases and their control. PP. 233-270. *In*: M.C. Saxena and K.B. Singh. (Eds.), The Chickpea. CAB International, Oxon, UK.
33. Newman, M.A., J. Conrads-Strauch, G. Scofield, M.J. Daniels and J.M. Dow. 1994. Defense related gene induction in Brassica campestris in response to defined mutants of *Xanthomonas campestris* with altered pathogenicity. Mol. Plant Microbe Interact. 7: 553–563.
34. Ori, N., Y. Eshed, G. Presting, D. Avov, S. Tanksley, D. Zamir and R. Fluhr.1997. The 12C family from the wilt disease resistance locus 12 belongs to the nucleotide binding leucine-rich repeat super family of plant resistance genes. Plant Cell. 9: 521–532.
35. Pietro, A.D. and I.G. Roncero. 1996. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: Purification, Characterization, and Production During Infection of Tomato plants. Phytopathol. 86(12): 1324-1330.
36. Pressey, R. 1996. Polygalacturonase inhibitors in bean pods. Phytochem. 42: 1267–70
37. Salvi, G., F. Giarrizzo, G. De Lorenzo and F. Cervone. 1990. A polygalacturonase-inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 136: 513-518.
38. Shanmugam,V. 2004. Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms. J. Microbiological Res. 09-014
39. Shieh, M.T., R.L. Brown, M.P. Whitehead, J.W. Cary, P.J. Cotty, T.E. Cleveland and R.A. Dean. 1997. Molecular genetics evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in *cotton balls*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3548–3552.
40. Sweetingham, M.W., R.H. Cruickshank and D.H. Wong.1986. Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of the ceratobasidiaceae. Trans. Br. Mycol. Sci. 86: 305-311
41. ten Have, A., W. Mulder, J. Visser and J.A. Van Kan. 1998. The endopolygalacturonase gene Bcpg 1 is required for full virulence of Botrytis cinerea. Mol. Plant Microbe Interact. 11: 1009–1016.
42. Toubart, P., A. Desiderio, G. Salvi, F. Cervone, L. Daroda, G. De Lorenzo, C. Bergmann, A.G. Darvill and P. Albersheim. 1992. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. Plant J. 2: 367-373
43. Westermeier, R. 2000. Electrophoresis in Practice, A Guide to Methode and Aplications of DNA and Protein Separations. 3rd ed., Wiley-Vch, New York.
44. Zamani, M.R., M. Motallebi and M.A. Arefpour. 2000. Comparative study of polygalacturonase activity from different Iranian isolates of *Fusarium oxysporum*. Iranian J. Agric. Sci. 31: 293-302.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.28.0]