

مطالعه اثر مهار کنندگی پروتئینهای ممانعت کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در وارپته درخشان گیاه لوبیا و تعیین توالی ژن کد کننده آن

اباصلت حسین زاده کلاگر^۱، محمدرضا زمانی^۱ و مصطفی مطلبی^۱

^۱پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی

چکیده

در این تحقیق، تأثیر مهار کنندگی PGIP استخراج شده از هیپوکتیل گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) وارپته درخشان روی آنزیم پلی گالاکتوروناز جدایه F15 قارچ *Fusarium oxysporum* (با شدت بیماری زایی زیاد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که این PGIP قادر است به میزان ۵۴.۵ درصد فعالیت آنزیم PG جدایه فوق را مهار نماید. با توجه به این نتایج جهت بررسی توالی ژن pgip این وارپته اقدام به تکثیر، کلون کردن، تعیین توالی و مقایسه آن با توالی ژنهای مشابه گزارش شده گردید. این مقایسه نشان داد که طول ژن کامل pgip در این وارپته (درخشان) برابر ۱۰۲۹ bp با محتوای GC برابر ۵۰.۱۵ درصد بوده که با توجه به (open reading ORF frame) موجود در آن میتواند یک پلی پپتید بطول ۳۴۲ اسید آمینه را کد نماید. برای اطمینان از صحت توالی بدست آمده علاوه بر استفاده از آنزیم *Pfu* برای تکثیر ژن مربوطه، تعیین توالی این ژن نیز در دو جهت انجام گرفت. توالی فوق برای تعیین تطابق با توالی ژنهای موجود در بانکهای اطلاعاتی DDBJ, EMBL, GeneBank و PDB مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که توالی DNA این ژن با توالی ژن pgip-1 از لوبیای وارپته Saxa به میزان صددرصد مشابهت دارد. همچنین مقایسه این توالی با توالی pgip-2 از لوبیای وارپته Pinto نشان داد که توالی ژن pgip وارپته درخشان علاوه بر اضافه داشتن ۲۷ نوکلئوتید در ابتدای ژن، در تعداد ۲۶ نوکلئوتید در طول ژن نیز با توالی pgip-2 اختلاف دارد.

کلمات کلیدی: لوبیا، PGIP، *Fusarium oxysporum*

مقدمه

در دیواره سلولی بسیاری از گیاهان دو لپه ای و در گیاهان تک لپه ای غنی از پکتین نظیر پیاز و تره و همچنین در آرابیدوپسیس و گل اطلسی گلیکوپروتئین‌های مهار کننده آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز شناسایی شده اند که قادرند از طریق تنظیم یا ممانعت فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز و کلونیزاسیون قارچی را محدود کنند (۱۰، ۱۱، ۱۶، ۲۷).

اگر چه گیاهان دارای پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورونازهای مختلفی هستند که عمدتاً توانایی تشخیص اختصاصی بسیاری از پلی‌گالاکتورونازهای قارچی را دارند ولی در برابر دیگر آنزیم‌های پکتیکی که منشأ گیاهی یا میکروبی دارند بی‌تأثیر هستند (۶).

ژن‌های کد کننده پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به صورت خانواده ژنی سازماندهی شده اند. اعضای مختلف هر خانواده ممکن است پروتئین‌هایی با صفات تقریباً مشابه کد کنند، اما ویژگی و عمل تنظیمی آنها متفاوت است. عمدتاً پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز به وسیله آلودگی پاتوژنی و سیگنال‌های مربوط به استرس القاء می‌شوند. قدرت تشخیص آنها مربوط به ساختار Leucine-rich (LRR repeat) آنها می‌باشد که میزان اختصاصی بودن

عوامل بیماریزای گیاهان مقدار زیادی از آنزیمهایی را که قادر به تخریب ترکیبات ساختمانی دیواره سلولی گیاه هستند تولید میکنند (۲۱). توانایی عوامل بیماریزای گیاهان برای تولید آنزیمهایی که پلی‌ساکاریدهای پیچیده دیواره سلولی گیاه را تجزیه میکنند احتمالاً اولین مرحله در فرآیند بیماریزایی میباشد (۲۲). یکی از مهمترین این آنزیمها آنزیم پلی‌گالاکتوروناز (Polygalacturonase, PG) بوده که توسط قارچهای بیماریزای مختلف از جمله قارچ *Fusarium oxysporum* عامل بیماری بوته زردی نخود (*Cicer arietinum*) ترشح میگردد (۱۳). این بیماری یکی از مهمترین بیماریهای نخود بوده و علائمی مانند پژمردگی، اختلال در فتوسنتز، کوچک ماندن و تقلیل در تعداد دانه‌ها را باعث میشود. این آنزیم‌ها از یک سو قطعه قطعه شدن و محلول نمودن هوموگالاکتورونان‌های دیواره سلولی را کاتالیز می‌کنند که سبب تخریب دیواره و پوسیدگی بافت گیاهی می‌شوند و از سوی دیگر باعث جدا شدن قطعات الیگو گالاکتورونیدی (Oligogalacturonide, OG) از دیواره سلولی گیاه می‌شوند، که میتوانند تحریک کننده پاسخ‌های دفاعی گیاه به حساب آیند.

در گوجه فرنگی تراریخت، بیان این پروتئین از لوبیا مقاومت به *Fusarium*، *Botrytis* یا *Alternaria* را افزایش نداده است (۱۲)، در حالی که بیان پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز گلابی در گوجه فرنگی تراریخت، تهاجم به برگها و میوهها توسط *Botrytis* را کاهش می دهد (۲۳).

با توجه به اهمیت PGIP در ایجاد مقاومت علیه عوامل بیماریزای قارچی، در این تحقیق از واریته درخشان لوبیا برای شناسایی و کلون کردن ژن *pgip* و نیز بررسی تاثیر متقابل PGIP با آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *F. oxysporum* استفاده گردید.

مناسب جهت تولید آنزیمهای پکتینی توسط قارچ *F. oxysporum* از محیط کشت زایموگرم Pectic (Zymogram medium, PZ) استفاده گردید (۳۵). 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. جهت کشت و نگهداری باکتری *E. coli* (DH5 α) از محیط کشت LB استفاده گردید.

آنها را تعیین می کند. در ژنوم لوبیا یک خانواده، که حداقل شامل ۵ ژن می باشد روی کروموزوم ۱۰ قرار گرفته اند (۱۰، ۱۷). نخستین ژن کد کننده پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز از گیاه لوبیا کلون شده است (۳۱). ضمناً این ژن ها از بسیاری از گونه های گیاهی دیگر نیز کلون شده اند (۲۴، ۲۹، ۳۰، ۳۲). باستثناء ژن های پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز مربوط به آرابیدوپسیس، تمشک و *majus Anthirrinum*، اغلب این ژن ها فاقد اینترون می باشند (۲۴، ۲۸). بیان پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتورونازی در گیاهان تراریخت (transgenic) مختلف به نتایج متضادی منجر شده است به عنوان مثال

مواد و روشها

جدایه قارچ:

جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* (F15) که در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت از استان آذربایجان شرقی (تبریز) جمع آوری و خالص سازی گردیده است.

محیطهای کشت:

برای نگهداری قارچ از محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) استفاده گردید. برای فراهم نمودن شرایط

اندازه گیری فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز:

۴/۲٪ (v/v) اسید سولفوریک ۹۶٪ [به مخلوط اضافه و سانتریفوژ شد (۱۲۰۰۰ xg) و میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفوتومتر 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.

استخراج پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز:

بذر وارپته درخشان لویا (*Phaseolus vulgaris*) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. پس از ضد عفونی بذرها با آب ژاول ۰/۰۵ درصد در خاک سترون شده و در دوره ۱۶ ساعته نوری کشت داده شد. برای استخراج پروتئین از هیپوکتیل گیاهان ۱۰ روزه استفاده گردید. برای این منظور از روش Bennett استفاده گردید (۴). ۲/ گرم از بافت گیاهی خشک شده توسط دستگاه Freeze drier، توزین شد و هم حجم آن از بافر استخراج پروتئین به آن افزوده گردید و به مدت یک ساعت در دمای پایین (Cold room) تکان داده شد تا به صورت یکنواخت (هموژن) درآمد. سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سرعت $15000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه توسط

برای بررسی میزان تولید آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *F. oxysporum*، جدایه F15 در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت PZ کشت داده شد. پس از ۶ روز میسلیم قارچ توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جمع آوری شد و محیط صاف شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) گردید. محلول بدست آمده بعنوان محلول حاوی آنزیمهای مترشحه در مراحل بعدی بکار رفت.

فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز با استفاده از روش کالمر (۷) همراه با تغییراتی، به شرح زیر اندازه گیری گردید. ۴۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۲۱۰ میکرولیتر محلول نخیره سوبسترا 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 بمدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. پس از سرد شدن ۵۰۰ میکرولیتر معرف آرسنومولیبیدات [۵٪ (w/v) آمونیم مولیبیدات، ۶٪ (w/v) دی سدیم هیدروژن آرسنات و

پس از اندازه گیری مقدار پروتئین استخراج شده از هیپوکتیل لوبیا و نیز میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ مورد مطالعه، مقدار ۳ میکروگرم از پروتئین حاوی PGIP و ۱۱۳ واحد آنزیمی مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز اندازه گیری گردید. جهت بررسی میزان مهار کنندگی این پروتئینها، درصد میزان کاهش فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز نسبت به شاهد در همان شرایط محاسبه گردید.

روش استخراج DNA ژنومی:

استخراج DNA ژنومی از برگهای گیاه لوبیا (واریته درخشان) آن به روش CTAB انجام شد (۱۴). DNA بدست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در ۲۰- درجه سانتیگراد برای استفاده بعدی نگهداری گردید.

آغازگرهای مورد استفاده:

آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن pgip واریته درخشان گیاه لوبیا به شرح زیر میباشند که restriction site آنها بصورت bold و یا bold/underline مشخص شده اند.

RB- 5' GGAATTC CATATGACTCAATTCAATATCCCAG3'

RB2- 5' GCAC GAGCTC TTAAGTGCAGGAAGGAAGAG3'

دستگاه سانتریفوژ یخچال دار مدل Sigma، سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، فاز رویی (Supernatant) به عنوان محلول حاوی پروتئینهای بافت گیاهی در دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره گردید. به منظور تغلیظ پروتئینهای استخراج شده از بافتهای گیاهی، از روش استن (۳۴) استفاده شد. در این روش، محلول پروتئینی با حجمی برابر از استن سرد (۲۰- درجه سانتیگراد) مخلوط گردید و به مدت حدود ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس مخلوط فوق با سرعت $\times g$ ۱۲۰۰۰ و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله با استفاده از خلأ خشک گردید تا استن موجود در آن خارج شود. پس از خارج شدن استن، رسوب در آب مقطر به طور کامل حل شد و به لوله‌های اپندورف منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش Bradford استفاده شد که در آن از پروتئین (BSA) Bovine serum albumin به عنوان استاندارد استفاده گردید (۵). مطالعه میزان مهار کنندگی پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز:

شرایط انجام PCR/اختصاصی:

PCR اختصاصی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی لوبیا، ۶۰ نانوگرم آغازگر، ۰٫۴ میلی مولار dNTP و ۲٫۵ واحد آنزیم *Taq polymerase* یا *Pfu* و ۲٫۵ میکرولیتر بافر (10X) (۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl, pH=8.4, ۵۰۰ میلی مولار KCl و ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$) صورت گرفت. قبل از انتقال نمونه ها به دستگاه ترموسایکلر هر کدام با یک قطره از روغن پارافین پوشش داده شد. سپس واکنش برای ۳۴ دور، شامل دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه، دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۴ دور، واکنش به مدت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

روش استخراج پلاسمید و کلون کردن:

استخراج پلاسمید به روش Alkaline lysis صورت گرفت (۲۶). برای کلون کردن ژن تکثیر شده از وکتور

pUC18 استفاده شد. وکتور مذکور و قطعه تکثیر شده توسط PCR توسط آنزیمهای *EcoRI* و *SacI* هضم گردید. Ligation توسط آنزیم T4 DNA ligase انجام شد. باکتری (*E. coli* (DH5 α) با استفاده از کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار به حالت مستعد شده درآمده و بمدت یکساعت همراه با DNA مربوطه جهت transformation در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس باکتریها پس از شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه در محیط SOB (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$) حاوی ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین گسترش داده شدند. در این مرحله کلونیهای سفید رنگ حاصله بعنوان کلونیهای حاوی قطعه مورد نظر انتخاب گردید. قطعه کلون شده پس از تایید توسط الگوی هضم آنزیمی و تعیین توالی (توسط شرکت SeqLab Gottingen, Germany) میزان تطابق آن با توالیهای موجود در پایگاههای اطلاعاتی و با استفاده از نرم افزار BLAST Network Service برای ژن مربوطه بررسی گردید.

نتایج

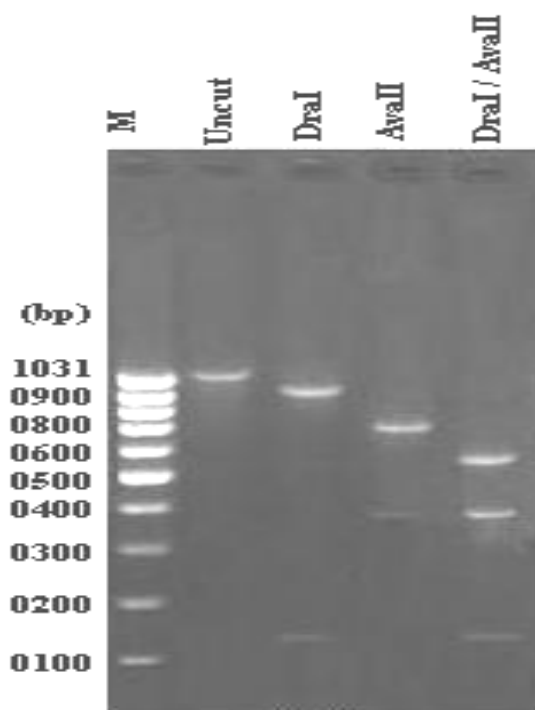
قارچهای فیتوپاتوژن برای حمله به بافتهای گیاهی، چندین آنزیم تخریب کننده دیواره سلولی را تولید میکنند. از جمله مهمترین این آنزیمها، پلی گالاکتوروناز میباشد. در دیواره سلولی بسیاری از گیاهان، پروتئینهای مهار کننده فعالیت آنزیمی (PGIP) وجود دارد که با آنزیمهای پلی گالاکتورونازی کمپلکس ویژه تشکیل میدهند و فعالیت آنها را کنترل مینمایند.

در این تحقیق جهت مطالعه و بررسی اثر مهار کنندگی PGIP واریته درخشان لوبیا بر آنزیم پلی گالاکتوروناز جدایه F15 قارچ *F. oxysporum* که در مطالعات قبلی بیماریزایی آن مورد بررسی قرار گرفته و بعنوان جدایه با شدت بیماریزایی زیاد (Highly virulent, HV) معرفی گردیده است، از هیپوکتیل استفاده گردید. ابتدا جهت بدست آوردن شرایط بهینه اثر مهار کنندگی PGIP بر آنزیم پلی گالاکتوروناز، از هیپوکتیل لوبیا پروتئین استخراج و اثر مقادیر مختلف آن (از ۱ تا ۵ میکروگرم با فاصله های ۰،۵ میکروگرم) بر این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده در شرایط بهینه، مقدار ۳ میکروگرم از پروتئین استخراج شده (PGIP) به محلول حاوی ۱۱۳ واحد آنزیم پلی گالاکتوروناز اضافه گردید. پس از مدت زمان لازم جهت

انجام عمل بازدارندگی توسط PGIP، میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز اندازه گیری شد. مقایسه میانگین بدست آمده از تکرارهای مربوط به میزان فعالیت آنزیم در این حالت با نمونه شاهد نشان داد که PGIP استخراج شده از واریته درخشان قادر است ۵۴،۵ درصد فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *F. oxysporum* را کاهش دهد.

با توجه به کاهش چشمگیر میزان فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *F. oxysporum* توسط PGIP واریته درخشان لوبیا، برای شناسایی و مطالعه ژن کد کننده این پروتئین از این گیاه، اقدام به تکثیر، کلون کردن و تعیین توالی ژن مربوطه گردید. بدین منظور استخراج DNA ژنومی از برگ گیاه صورت گرفت. پس از بهینه سازی شرایط PCR، از دو پرایمر اختصاصی RB و RB2 جهت تکثیر ژن مورد نظر استفاده گردید. در دو پرایمر مذکور به ترتیب جایگاههای هضم آنزیمی *EcoRI* / *NdeI* و *SacI* برای کلون کردن در وکتور pUC18 طراحی شدند. طول DNA بدست آمده حدود ۱۰۵۰ bp و برابر قطعه مورد انتظار بود (شکل ۱). الگوی هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *DraI* و *AvaII* قطعه DNA تکثیر شده را مورد تایید قرار داد (شکل ۱). همچنین قطعات تکثیر شده با استفاده از دو پرایمر داخل ژنی SSRf و SSRr که از ناحیه میکروساتلایتی این ژن

انتخاب شده بودند (شکل ۲B) نیز DNA تکثیر شده را مورد تایید قرار داد.



شکل ۱: تکثیر ژن *pgip* واریته درخشان توسط PCR و الگوی هضم آنزیمی آن توسط آنزیمهای *DraI - AvaII* و مخلوط آنها، M= مارکر ملکولی

این واریته (درخشان) برابر ۱۰۲۹bp (شکل ۲B) با محتوای GC برابر ۵۰٫۱۵ درصد بوده که با توجه به ORF (open reading frame) موجود در آن میتواند یک پلی پپتید بطول ۳۴۲ اسید آمینه را کد نماید (شکل ۲B). برای اطمینان از صحت توالی بدست آمده علاوه بر استفاده از آنزیم *Pfu* برای تکثیر ژن مربوطه، (سنتز DNA با استفاده از این آنزیم نسبت به آنزیم *Taq* DNA polymerase از خطای بسیار کمتری برخوردار است) تعیین توالی این ژن نیز در دو جهت انجام گرفت

قطعه تایید شده همراه با وکتور pUC18 با آنزیمهای *EcoRI* و *SacI* هضم و ligation صورت گرفت. پلاسمید حاوی DNA تکثیر شده از کلونیهای سفید بدست آمده در محیط کشت انتخابی، استخراج و بنام pUCARBD نامگذاری شد. صحت قطعه کلون شده توسط الگوی هضم آنزیمی و PCR تایید شده و پس از خالص سازی برای تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات بدست آمده نشان داد که طول ژن کامل *pgip* در

مشابهت دارد (شکل ۳). همچنین مقایسه این توالی با توالی pgip-2 از لوبیای وارپته Pinto، گزارش شده توسط Leckie و همکاران (۲۰) نشان داد که توالی ژن pgip وارپته درخشان علاوه بر اضافه داشتن ۲۷ نوکلئوتید در ابتدای ژن، در تعداد ۲۶ نوکلئوتید در طول ژن نیز با توالی pgip-2 اختلاف دارد (شکل ۳).

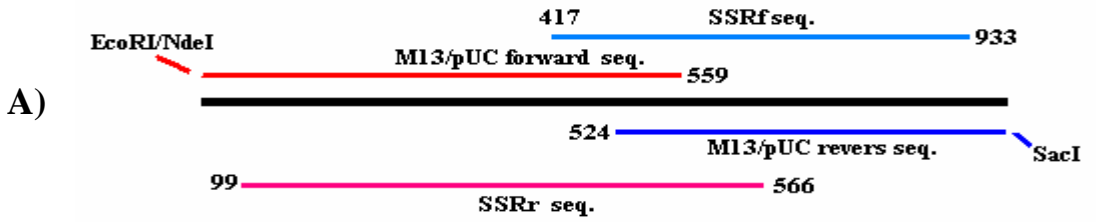
تشخیص اختصاصی دارند. عمدتاً PGIP ها در برابر PG های قارچی مؤثرند ولی در برابر دیگر آنزیم‌های پکتیکی که منشأ گیاهی یا میکروبی دارند بی تأثیر هستند (۶). نه تنها PGIP هایی که از منابع مختلف گیاهی بدست آمده‌اند فعالیت بازدارنده متفاوتی دارند بلکه PGIP هایی که از یک منبع گیاهی واحد تولید می‌شوند نیز قدرت ممانعتی متفاوتی روی انواع PG های قارچی دارند. به عنوان مثال PGIP لوبیا در مقابل PG های قارچی *Aspergillus niger*، *Botrytis cinerea*، و *Fusarium moniliforme* مؤثر است (۸، ۲۳). جالب تر این که، PGIP لوبیا در مقابل PG قارچ *Colletotrichum lindemuthianum* نسبت به PG قارچ غیر پاتوژن *C. lagenarium* بسیار مؤثرتر است. این موضوع، اهمیت انتخاب PGIP های مناسب را برای مقابله بهتر با آلودگی قارچی نشان می‌دهد (۱۹).

(شکل ۲A). توالی فوق برای تعیین تطابق با توالی ژنهای موجود در بانکهای اطلاعاتی DDBJ, EMBL, GeneBank و PDB مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که توالی DNA این ژن با توالی ژن pgip-1 از لوبیای وارپته Saxa که توسط Toubart و همکاران (۳۱) گزارش شده است، به میزان صددرصد

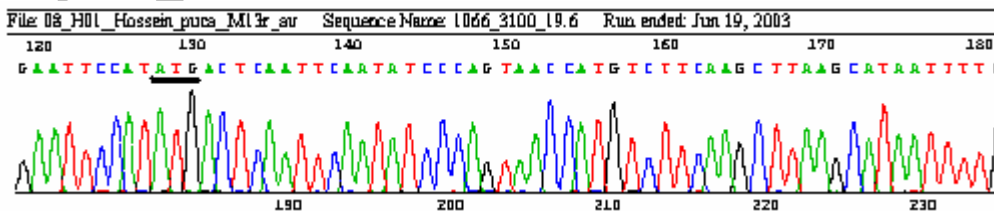
بحث

آنزیمهای پلی گالاکتورونازی توسط اغلب قارچ‌های فیتوپاتوژنیک تولید می‌شوند و اشکال ایزوآنزیمی مختلفی را نشان می‌دهند. این اشکال مختلف، در پایداری، فعالیت ویژه، pH اپتیمم، انتخاب سوبسترا و انواع الیگوساکاریدهای آزاد شده، متفاوت هستند. احتمالاً PG های مختلف در برخی شرایط متفاوت و روی میزبان های مختلف سازگار شده اند و بر این اساس تکامل یافته اند (۹، ۱۸). بر همین اساس در مطالعات قبلی انجام شده در این آزمایشگاه، جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* جمع آوری و از لحاظ شدت بیماری زایی دسته بندی شده و نیز آنزیم PG این قارچ‌ها خالص سازی و بررسی شده است (۲).

گیاهان دارای PGIP های مختلفی هستند که در مقابل بسیاری از PG های تولید شده توسط قارچ‌ها، توانایی



1 atgactcaattcaatatcccagtaaccatgtcttcaagcttaagcataatnttggtcatt
 M T Q F N I P V T M S S S L S I I L V I
 61 cttgtatccttgagaactgcactctcagagctatgcaaccacaagataagcaagccctt
 L V S L R T A L S E L C N P Q D K Q A L
 121 ctccaaatcaagaaagaccttggcaacccaaccactctctcttcatggcttccaaccacc
 L Q I K K D L G N P T T L S S W L P T T 60aa
 181 gactgttgtaacagaacctggctaggtgtttatgagacaccgacacccaacatatacgc
 D C C N R T W L G V L C D T D T Q T Y R
 241 gtcaacaacctcgacctctccggccataaacctcccaaacctaccctatcccttctctcc
 V N N L D L S G H N L P K P Y P I P S S
 301 ctgcaccaacctcccctacctcaatnttctatacattggcgccatcaataacctcgtgggt
 L A N L P Y L N F L Y I G G I N N L V G 120aa
 361 ccaatcccccccgccatcgctaaactcacccaactccactatctctatatacactca**caacc**
 P I P P A I A K L T Q L H Y L Y I T H T
 B) 421 **aatgtctccggcgca**aataccgatttcttgtcacagatcaaaacctcgtcacccctcgac
 N V S G A I P D F L S Q I K T L V T L D
 481 ttctctacaacgcctctccggcaccctccctccctccatctcttctctccccaacctc
 F S Y N A L S G T L P P S I S S L P N L 180aa
 541 ggagga**atcacattcgacggcaacc**gaatctcggcgccatccccgactcctacggctcg
 G G I T F D G N R I S G A I P D S Y G S
 601 ttttcgaagctgtttacggcgatgaccatctcccgcaaccgctcaccgggaagattcca
 F S K L F T A M T I S R N R L T G K I P
 661 ccgacgtttgcgaatctgaacctggcgcttctgacttgtctcggaacatgctggagggt
 P T F A N L N L A F V D L S R N M L E G 240aa
 721 gacgcgtcgggtgttggctcgggtcagataagaacacgaagaagatacatctggcgaagaac
 D A S V L F G S D K N T K K I H L A K N
 781 tctcttgcctttgatttggggaaagtgggggtgtcaaagaactgaacgggttggatctg
 S L A F D L G K V G L S K N L N G L D L
 841 aggaacaacctatctatgggacgctacctcagggaactaacgcagctaaagtcttctgcaa
 R N N R I Y G T L P Q G L T Q L K F L Q 300aa
 901 agtttaaagtgtgagcttcaacaatctgtgcgggtgagattcctcaagggtgggaacttgaaa
 S L N V S F N N L C G E I P Q G G N L K
 961 aggtttgacgtttcttcttatgccaacaagaagtgtgtgtggttctcctcttctctcc
 R F D V S S Y A N N K C L C G S P L P S
 1021 tgcacttaa 342aa
 C T



شکل ۲: A) استراتژی تعیین توالی DNA ژن *pgip* در دو رشته مقابل با PCR از واریته درخشان گیاه لوبیا. B) توالی نوکلئوتیدی ژن فوق الذکر همراه با توالی اسید آمینه ای آن. کدون شروع (ATG) و خاتمه (TAA) در ابتدا و انتها بصورت bold مشخص شده اند. توالیهای bold, underline نیز نشاندهنده پرایمرهای میکروساتلایتی داخل ژنی میباشند که برای تایید PCRی قطعه تکثیر شده مورد استفاده قرار گرفته اند. C) بخشی از گراف حاصل از تعیین توالی ژن *pgip*، کدون شروع در آن مشخص شده است.

<i>pgipD</i>	ATGACTCAAT	TCAATATCCC	AGTAACCATG	TCTTCAAGCT	TAAGCATAAT	50
<i>pgip1</i>C.....	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	TTTGGTCATT	CTTGTATCTT	TGAGAAGTGC	ACTCTCAGAG	CTATGCAACC	100
<i>pgip1</i>C.....A.....	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	CACAAGATAA	GCAAGCCCTT	CTCCAAATCA	AGAAAGACCT	TGGCAACCCA	150
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>C.....	
<i>pgipD</i>	ACCACTCTCT	CTTCATGGCT	TCCAACCACC	GACTGTTGTA	ACAGAACCCTG	200
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>C.....C.....	
<i>pgipD</i>	GCTAGGTGTT	TTATGCGACA	CCGACACCCA	AACATATCGC	GTCAACAACC	250
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	TCGACCTCTC	CGGCCATAAC	CTCCCAAAC	CCTACCCTAT	CCCTTCCTCC	300
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>T.....	
<i>pgipD</i>	CTCGCCAACC	TCCCCTACCT	CAATTTTCTA	TACATTGGCG	GCATCAATAA	350
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>T.....	
<i>pgipD</i>	CCTCGTCGGT	CCAATCCCC	CCGCCATCGC	TAAACTCACC	CAACTCCACT	400
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	ATCTCTATAT	CACTCACACC	AATGTCTCCG	GCGCAATACC	CGATTTCTTG	450
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>C.....	
<i>pgipD</i>	TCACAGATCA	AAACCCTCGT	CACCCTCGAC	TTCTCCTACA	ACGCCCTCTC	500
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	CGGCACCCTC	CCTCCCTCCA	TCTTCTCTCT	CCCCAACCTC	GGAGGAATCA	550
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>A.....TC.....	
<i>pgipD</i>	CATTCGACGG	CAACCGAATC	TCCGGCGCCA	TCCCCGACTC	CTACGGCTCG	600
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	TTTTCGAAGC	TGTTTACGGC	GATGACCATC	TCCCGCAACC	GCCTCACCGG	650
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>C.....T.....	
<i>pgipD</i>	GAAGATTCCA	CCGACGTTTG	CGAATCTGAA	CCTGGCGTTC	GTTGACTTGT	700
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>G.....	
<i>pgipD</i>	CTCGGAACAT	GCTGGAGGGT	GACGCGTCGG	TGTTGTTCCG	GTCAGATAAG	750
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>A.....A.....	
<i>pgipD</i>	AACACGAAGA	AGATACATCT	GCGAAGAAG	TCTCTTGCTT	TTGATTTGGG	800
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>C.....C.....	
<i>pgipD</i>	GAAAGTGGGG	TTGTCAAAGA	ACTTGAACGG	GTTGGATCTG	AGGAACAACC	850
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	GTATCTATGG	GACGCTACCT	CAGGGACTAA	CGCAGCTAAA	GTTTCTGCAA	900
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>G.....G.....C.....	
<i>pgipD</i>	AGTTTAAATG	TGAGCTTCAA	CAATCTGTGC	GGTGAGATTC	CTCAAGGTGG	950
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>	
<i>pgipD</i>	GAACCTGAAA	AGGTTTGACG	TTTCTTCTTA	TGCCAACAAC	AAGTGCTTGT	1000
<i>pgip1</i>	
<i>pgip2</i>C.....A.....G.....	
<i>pgipD</i>	GTGGTTCTCC	TCTTCCTTCC	TGCACTTAA			1029
<i>pgip1</i>			1029
<i>pgip2</i>G.....			1002

شکل ۳: تطابق توالی نوکلئوتیدی ژن *pgip* واریته درخشان گیاه لوبیا (*pgip-D*) با توالی *pgip1* و *pgip2* به ترتیب از واریته های *Saxa* و *Pinto* از گیاه لوبیا

۱۲). بر اساس گزارش‌های منتشر شده در تمام اندام‌های لوبیای در حال رشد و در سوسپانسیون کشت سلولی، میزان کمی از فعالیت PGIP تشخیص داده شده است و میزان زیاد PGIP را می‌توان در هیپوکتیل جوان یافت (۲۵).

با توجه به مطالب فوق، ضروری است که قبل از انتقال ژن به گیاه جدید، ویژگی PGIP‌های مختلف را در شرایط *in vitro* مطالعه نمود. به همین دلیل در این تحقیق، اثر متقابل بین PGIP لوبیا و PG قارچ *F. oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که این نوع PGIP بر روی PG قارچ مذکور به میزان چشمگیری اثر مهاری دارد.

نخستین ژن کدکننده PGIP از گیاه *Phaseolus vulgaris* کلون شده است (۳۱). تاکنون ژن‌های pgip از بسیاری گونه‌های گیاهی دیگر نیز کلون گردیده است (۱۰). با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق ژن کامل pgip در واریته درخشان گیاه لوبیا تکثیر، کلون و توالی آن تعیین و تطابق توالی این DNA با توالی ژنهای مشابه موجود در بانکهای اطلاعاتی نشان داد که توالی این ژن با توالی ژن pgip واریته Saxa گیاه لوبیا صددرصد مشابهت دارد. مقایسه این توالی با توالی ژن pgip-2 واریته Pinto گیاه لوبیا نشان میدهد که علاوه بر اضافه

PGIP تخلیص شده از گلابی به طور کامل از عمل آنزیم‌های PG قارچ‌های *A. niger*، *B. cinerea* و *Dithiorella gregaria* جلوگیری می‌کند ولی اندکی از فعالیت PG‌های *Penicillium expansum* را ممانعت می‌نماید در صورتی که بر فعالیت PG مربوط به قارچ *F. oxysporum* اثری ندارد (۱). یک نوع PGIP در سیب در مقابل چهار نوع PG مربوط به *B. cinerea* تأثیر بازدارنده متفاوتی را نشان می‌دهد (۳۳).

PG مربوط به قارچ *F. moniliforme* به وسیله PGIP‌های میوه گوجه فرنگی، پیاز، گل اطلسی یا آرابیدوپسیس مهار نمی‌شود (۱۰، ۱۵). فعالیت PGIP در برخی گیاهان، ترکیبی از فعالیت‌های ممانعتی مختلف است. در طی تخلیص PGIP از هیپوکتیل‌های لوبیا، فعالیت ممانعتی آن در مقابل PG قارچ *Sclerotium rolfsii* از بین می‌رود. با روش‌های متفاوت کروماتوگرافی جذبی، دو PGIP از لوبیا جدا شده‌اند که از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی یکسانند ولی فعالیت ممانعتی متفاوتی دارند. یکی از این PGIP‌ها، آنزیم PG قارچ *A. niger* را کنترل می‌کند ولی روی PG قارچ *F. moniliforme* تأثیری ندارد. در حالی که PGIP دوم، از عمل هر دو آنزیم قارچی جلوگیری می‌نماید (۳، ۱۰،

بودن ۲۷ نوکلئوتید در ابتدای این توالی، در تعداد ۲۶ بررسیهای بیشتر نشان میدهد که این تفاوت منجر به نوکلئوتید در طول ژن نیز با توالی pgip-2 اختلاف دارد. ایجاد تفاوت در ۱۰ اسید آمینه میگردد.

منابع

- 1- Abu-Goukh, A. A., L. C. Greve, and J. M. Labavitch. 1983. Purification and partial characterization of "Bartlett" pear fruit polygalacturonase inhibitors. *Physiological Plant Pathology* 23: 111-122.
- 2- Alani B., M. Motallebi, and M.R. Zamani. 2004. "Purification and partial characterization of polygalacturonase from highly virulent (HV) isolate of *Fusarium oxysporum* (F23)." Iranian Journal of Biology. 16(4) : 1-11.
- 3- Albersheim, P., and A. Anderson. 1971. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1815-19.
- 4- Bennett, A., J. M. Labavitch, A. Powell, and H. Stotz. 1996. Plant inhibitors of fungal polygalacturonases and their use to control fungal disease. Regents of the university of California, Oakland, Calif, United states.
- 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. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- 6- Cervone, F., De Lorenzo, G., Pressey, R., Darvill, A., and Albersheim, P. 1990. Can Phaseolus PGIP inhibit pectic enzymes from microbes and plants? *Phytochemistry*. 29, 447-449.
- 7- Collmer A., J. L. Ried and M. S. Mount. 1988. Assay methods for pectic enzymes. *Methods in Enzymology*. 161(329-335).
- 8- Cook BJ, Clay RP, Bergmann CW, Albersheim P, Darvill, AG. 1999. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 703-711.
- 9- De Lorenzo, G., and F. Cervone. 1997. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs): their role in specificity and defense against pathogenic fungi. Chapman & Hall, New York.
- 10- 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.

- 11- DeLorenzo G., Ferrari S., 2002. Polygalacturonase inhibiting proteins in defense against Phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 295-299.
- 12- Desiderio, A., B. Aracri, F. Leckie, B. Mattei, and G. Salvi. 1997. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 852-60.
- 13- 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.
- 14- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- 15- Favaron, F., C. Castiglioni, and P. Di Lenna. 1993. Inhibition of some rot fungi polygalacturonases by *Allium cepa* L. and *Allium porrum* L. extracts. *J. Phytopathol.* 139: 201-6.
- 16- Federici, L., Caprari, C., Mattei, B., Savino, C., Di Matteo, A., De Lorenzo, G., Cervone, F., and Tsernoglou, D. 2001. Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). *PNAS* 98: 23, 13425-13430.
- 17- Ferrari S., Vairo D., Ausubel F.M, Cervone G., De Lorenzo G. 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.
- 18- Herron, S., J. Benen, R. Scavetta, J. Visser, and F. Journak. 2000. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8762–69.
- 19- 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.
- 20 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 Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* 18 : 9: 2352–2363.
- 21- Patino B., ML Posada, MT Gonzalez-Jaen & C. Vazquez. 1997. The course of pectin degradation by polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Microbios* 91: 47-54.
- 22- Petrini O. & GB Ouellette. 1994. Host wall alterations by parasitic fungi. APS Press St. Paul, Minnesota, USA.

- 23- Powell, A. L. T., Van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L. C., Bennett, A. B., and Labavitch, J. M. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 942-950.
- 24- Ramanathan, V., Simpson, C. G., Thow, G., Iannetta, P. P. M., McNicol, R. J., and Williamson, B. 1997. cDNA cloning and expression of polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) from red raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Exp. Bot.* 48, 1185-1193.
- 25- Salvi, G., F. Giarrizzo, G. De Lorenzo, and F. Cervone. 1990. A polygalacturonase inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Plant Physiol* 136: 513-518.
- 26- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2000. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York, NY.
- 27- Schillberg, S., Zimmerman, S., Zhang, M. Y., and Fischer, R. 2001. Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Res.* 10, 1-12.
- 28- Steinmayr, M., Motte, P., Sommer, H., Saedler, H., and Schwarz-Sommer, Z. 1994. FIL2, an extracellular leucine rich repeat protein, is specifically expressed in Antirrhinum flowers. *Plant J.* 5, 459-467.
- 29- Stotz, H. U., Contos, J. J. A., Powell, A. L. T., Bennett, A. B., and Labavitch, J. M. 1994. Structure and expression of an inhibitor of fungal polygalacturonases from tomato. *Plant Mol. Biol.* 25, 607-617.
- 30- Stotz, H. U., Powell, A. L. T., Damon, S. E., Greve, L. C., Bennett, A. B., and Labavitch, J. M. 1993. Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett. *Plant Physiol.* 102, 133-138.
- 31- Toubart, P., Desiderio, A., Salvi, G., Cervone, F., and Daroda, L. 1992. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant J.* 2, 367-373.
- 32- Yao, C. L., Conway, W. S., Ren, R. H., Smith, D., Ross, G. S., and Sams, C. E. 1999. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol. Biol.* 39, 1231-1241.
- 33- Yao, C., W. Conway, and C. Sams. 1995. Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from apple fruit. *Phytopathol.* 85: 1373-77.
- 34- Zamani, M. R. 1995. The pectic enzyme of *Rhizoctonia solani* AG-8 strains. PhD Thesis, Australia, Murdoch University, pp.123.
- 35- Zamani M.R., M. Motallebi, and M.J. Harighi. 2001 "Pectic enzyme patterns of *Fusarium oxysporum* isolates from chickpea in Iran. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.* 12(1):17-21.

PGIP-PG interaction, cloning and partial characterization of pgip gene from *Phaseolus vulgaris* cv. Derakhshan

Hosseinzadeh Colagar A.², M.R. Zamani¹, and M. Motallebi¹

¹National Research Center for Genetic Engineering & Biotechnology (NRCGEB), Tehran, Iran

²Biology Dept., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, Iran.

Abstract:

The cell walls of some dicotyledonous plants (pear, tomato, apple etc.) and a few monocotyledonous plants contain a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) that binds to and inhibits fungal endopolygalacturonase. PGIP has a great potential for limiting fungal colonization by acting as both inhibitors and regulators of fungal polygalacturonases activity and by favoring the release of oligogalacturonide (OG) fragments, which are elicitors of a variety of defense responses. In this study, inhibitory effect of PGIP extracted from *Phaseolus vulgaris* cv. Derakhshan on polygalacturonase enzyme of *Fusarium oxysporum* was analyzed. PG enzyme was isolated from highly virulent isolate of *F. oxysporum* (F15). The PG activity was inhibited by hypocotyle PGIP about 54.5%.

For pgip gene amplification, genomic DNA from leaves were used. The expected PCR product (1047 bp) was amplified with specific primers, which contain appropriate site for cloning. The PCR product was confirmed by restriction digestion. Pgip gene (1029 bp) was subcloned into pUC18 vector. The sequence of the cloned gene was aligned with related DNA sequences in the GeneBank. The results showed 100% similarity of this sequence to pgip-1 of *Phaseolus vulgaris* cv. Saxa. There was differed in 26 nt from pgip-2 sequence from *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto.

Key words: PGIP-PG interaction- pgip gene, *Fusarium oxysporum*, *Phaseolus vulgaris*
