

***Verticillium dahliae* ile inokule Edilen Yonca Bitkisinden (*Medicago sativa* cv. Vertus) Elde Edilen Fenilalanin Amonia Lyaz Enziminin Kademeli Olarak Saflaştırılması**

Murat D K L TA

Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Van, Türkiye

Gelişim Tarihi (Received) :04.04.2012

Kabul Tarihi (Accepted): 01.07.2012

Özet: *Verticillium dahliae* ile inokule edilen yonca fidelerinden (*Medicago sativa* L. cv. Vertus) elde edilen fenilalanin amonia lyaz (EC 4.3.1.24, PAL) enzim aktivitesindeki artış inokulasyondan 48 saat sonra ölçülmüştür. PAL enziminin % 0-50 (NH₄)₂SO₄ ve Sephadex G-100 jel filtrasyon yöntemi ile saflaştırılması, %75 ve %60 lık geri kazanım ve 1.75 ve 1.97 kat artışı sağlanmıştır. Enzim saflaştırma fraksiyonları arasında aktivite açısından önemli farklılıkların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu özellik patojen ile ilgili proteinlerin detaylı karakterizasyonu için önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Amonyum sulfat, jel filtrasyonu, *Verticillium*, yonca, PAL.

Stepwise Purification of Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL) Enzyme Obtained from Lucerne (*Medicago sativa* cv. Vertus) Inoculated with *Verticillium dahliae*

Abstract: An increased activity in phenylalanine ammonia lyase (EC 4.3.1.24, PAL) enzyme in lucerne seedlings (*Medicago sativa* L. cv. Vertus) following inoculation with *Verticillium dahliae* was measured after 48 h of inoculation. Purifications of PAL with 0-50% (NH₄)₂SO₄ precipitation and Sephadex G-100 gel filtration resulted in 1.75 and 1.97 fold increases with 75 and 60 % recoveries, respectively. This study showed that the purification of the enzyme clearly resulted in significant differences in respect to activities between fractions. This property could be important for further characterization of pathogen-related proteins.

Key Words: Ammonium sulphate precipitation, gel filtration, *Verticillium*, lucerne, PAL.

GİRİŞ

Fenol bileşiklerini oksidize eden enzimlerden olan PAL, sağırlık bitkilerde yaygın olup, abiyotik veya biyotik stres koşullarında artış göstermektedir. Enzim konsantrasyonundaki artış genel itibarıyla bitki kökenli olup, enfeksiyon sırasında fungal etmenlerden açığa çıkan enzimler çok düşük oranlarda katkıda bulunmaktadır. Bitkiler, dayanıklılık durumlarına göre, farklı seviyelerde savunma enzimleri sentezlemekte olup, en önemli savunma enzimlerinden olan fenilalanin amonia lyaz (EC 4.3.1.24, PAL), lignin ve fitoaleksin sentezi ile sonuçlanacak biyokimyasal döngünün ilk basamağını teşkil eder (Dikilitas, 2003). Özellikle biyotik stres faktörlerinin etkisinin belirlenmesinde önemli bir kriter olarak değerlendirilen PAL, enfeksiyon aşamasında sentezlenmesi çok kısa sürede olmakta ve genel olarak seviyesi, enfeksiyon süresine, bitki genetiğine ve etmenin iddetine bağlıdır (Tang, 2001).

PAL, fenilpropanoid sentezinde ilk aşamayı oluşturan bir enzim olduğundan savunmada önemli rol oynayan bir amino asit olan fenilalaninden amin grubunu uzaklaştırarak onu yine dayanıklılıkta süberin, lignin, flavanoid ve fitoaleksin gibi ikincil metabolitlerin sentezlenmesinde etkili olan sinamik aside çevirir (Dikilitas, 2003; Bahadır ve ark., 2012). Bu metabolitler çoğunlukla hücre duvarında depolanarak strese karşı bitki savunmasında kullanılırlar (Hammerschmidt, 1999). PAL aktivitesi çok kompleks bir mekanizma sonucu olmaktadır ve birçok bitki türlerinde PAL enzimini kodlayan çoklu gen yapısı bulunmaktadır (El-Shora, 2002). Bu enzim, çoğunlukla yapraklarda

sentezlenmesi için biyotik stres yanında abiyotik stres de enzimin sentezlenmesinde önemli yer tutar. Dolayısıyla ile çoklu stres durumlarında önemli bir markör enzim durumundadır. Örneğin, *V. albo-atrum* ile inokule edilen solgunluk hastalığına dayanıklı yonca bitkilerinde PAL enziminin seviyesinde bir artış gözlenirken tuz stresinin de bitki üzerinde ikincil bir stres faktörü olarak etkili olduğu durumlarda PAL konsantrasyonunda azalma görülmüştür, abiyotik stresin devamı ile PAL seviyesi minimum düzeye inmiştir, bu durum bitkide hızlı ölüm ve nekrozlarla fizyolojik olarak kendini göstermiştir (Turco ve ark., 2002; Dikilitas, 2003; Turco ve ark., 2007).

PAL enziminin sentezlenmesi sırasında protein konsantrasyonunda bir artış görülmekte, dolayısıyla ile patojen tarafından üretilen protein, hastalığın karakterizasyonunda önemli bir yer tutmaktadır. Böyle durumlarda proteinin izolasyonu ve moleküler ağırlıklarına göre sıralanması ve farklı moleküler ağırlıklarına sahip proteinlerin patojenisitede oynadığı rol sadece proteinlerin saflaştırılması ile mümkündür (Hu ve ark., 2012). Ayrıca bir hastalık periyodunda sentezlenen proteinler ile farklı aktivitelere sahip proteinlerin birbirinden ayrıştırılması için de saflaştırma önemli bir yer tutmaktadır. Enzim aktiviteyi ortamda bulunan klorofil, nükleik asit veya karotenoid gibi protein yapısına sahip maddeler ile etkileşim halinde bulunduğu için, bu yapıların enzim ölçümü sırasında kısmi olarak da olsa ortamdaki uzaklaştırılması enzim stabilitesi için büyük önem taşımaktadır.

Enzim saflaştırılması, proteinlerin özelliklerinin daha iyi anlaşılması ve karakterizasyonu için de önemlidir (Hu ve ark., 2012). Özellikle, enzimlerin inhibisyonunda farklı karakterdeki proteinlerin aktivitelerinin ölçülmesi biyokimyasal döngünün belirlenmesinde önemli yer tutmaktadır.

Fungal etmenlerden *V. dahliae* yonca, pamuk, ve sebze alanları ve hatta ağaçlarda ciddi kayıplara yol açan önemli bir solgunluk hastasıdır. Bitkilerde oluştuğu dayanıklılık mekanizmaları birçok çalışmada detaylı olarak açıklanmıştır (Levin ve ark., 2003; Mohammadi ve ark., 2007; Palmero ve ark., 2010). Bu çalışmada, *V. dahliae* ile inokule edilmiş yonca bitkisinden izole edilen PAL, hem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ile hem de Sephadex G-100 jel filtrasyon yöntemi ile kademeli olarak saflaştırılmıştır. Böylece, farklı karakterdeki stres etmenlerinin aktivitelerini de belirlemek, protein üzerinde detaylı karakterizasyon yapmak mümkün olabilecektir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bitkilerin inokulasyonu

Kökleri topraklardan arındırılan yonca fideleri (*Medicago sativa* cv. Vertus) domates bitkilerinden izole edilen ve PDA üzerinde geliştirilen *V. dahliae* izolatu ile yaklaşık 30 dakika süre ile 100 ml (1×10^7 spor/ml) fungus süspansiyonu içinde kök daldırma yöntemi ile inokule edilmiştir. Inokule edilen bitkiler yeniden aynı toprağa dikilmiştir. Kontrol bitkileri aynı lemeden geçmi ancak spor solüsyonu yerine saf su kullanılmıştır. Kullanılan fungal izolat yoncaya zayıf patojen olarak teyit edilmiştir (Latunde-Dada ve ark., 1987; Dikilita, 2003).

Örnek hazırlama ve homojenizasyon

Yaklaşık olarak 10 g yaprak, 4°C'de 100 ml, 50 mM Tris-HCl [(4 mM Na_2EDTA , 10 mM mercaptoethanol, 2 mM askorbik asit, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), pH 8.4] içinde 1 g asit ile yıkanmış kum yardımı ile homojenize edilmiştir.

Homojenat daha sonra iki tabaka halinde bulunan ıslak filtre kağıtlarından geçirilmiştir (Mira Cloth, Calbiochem) ve elde edilen filtrat 4°C'de, 20000 g'de 20 dakika santrifuj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süzük, yaklaşık 18 saat boyunca 2 litre diyaliz tampon çözeltisine (50 mM Tris-HCl, pH 8.4, 10 mM mercaptoethanol, 4 mM Na_2EDTA ve 0.5 mM PMSF) karıştırılarak diyaliz edilerek iyonlarından arındırılmıştır. Bu amaçla elde edilen ekstrakt "ham ekstrakt" olarak adlandırılmıştır. Protein ve karbohidrat içeren ham ekstrakt daha sonra kısmi olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve Sephadex G-100 jel filtrasyon yöntemi ile saflaştırılmıştır (Tang, 2001; Hu ve ark., 2012).

Ham ekstrakt birinci adımda % 0-50 saturasyon verecek ve çökelti oluşturacak ekilde katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ün çok yavaş ekilde solüsyona ilavesi ve manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılması sonucu elde edilmiştir. Solüsyonda kullanılan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarı <http://www.encorbio.com> sitesinden

hesaplanarak kullanılmıştır. Bu amaçla elde edilen çökelti, solüsyonun 4°C'de 10000 g'de 90 dakika santrifuj edilmesi ile saflaştırılmıştır. Çökelti daha sonra yaklaşık 10 ml Tris-HCl (pH 8.4) tampon solüsyonu içinde çözünümü ve 4°C'de 24 saat süre ile iki kez tampon çözeltisi yenilenerek diyaliz edilmiştir. Bu amaçla elde edilen süzük "saflaştırılmış enzim" olarak adlandırılmıştır (Tang, 2001).

İkinci amaçla ise bir önceki amaçla elde edilen sıvı kısım, tampon çözelti ile 100 ml'ye tamamlanmış ve Sephadex G-100 (2.2 x 50 cm) kolonlarından saatte 25 ml geçirilerek 2'er ml olarak ayrı ayrı toplanmış ve aktiviteleri ayrı ayrı ölçülmüştür. Daha sonra aktiviteleri yüksek olanlar bir kap içinde toplanarak protein içeriği belirlenmiştir.

Süzük içindeki PAL aktivitesi kısmi saflaştırmalardan önce ve sonra olmak üzere belirlenmiştir.

PAL Aktivitesinin Belirlenmesi

PAL aktivitesi Bolwell ve ark. (1985)'na göre, küçük moleküller yapılarak ölçülmüştür (Dikilita, 2003). Reaksiyon karışımı aşağıdaki içeriklerden oluşmuştur: 1.5 ml 4 mM Na_2EDTA , 10 mM mercaptoethanol, 5 mM askorbik asit, ve 1 μM PMSF içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8.4) ve 1 ml 10 mM L-phenylalanine (reaksiyon içindeki final konsantrasyon).

Reaksiyon daha sonra yaklaşık olarak 0.4-0.5 mg protein içeren 0.5 ml hacminde enzim ekstraktının eklenmesi ile başlatılmış ve 40°C'de 2 saat süre ile su banyosunda inkübe edilmiştir.

Çalışma iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür, kontrol grubu L-fenilalanin yerine aynı konsantrasyonda D-fenilalanin izomeri kullanılarak oluşturulmuştur. Reaksiyon karışımı hiç bekletilmeden 290 nm dalga boyunda Spektrofotometrede (UV-1601 Shimadzu) okunmuş, 30'er dakika arayla 2 saat boyunca absorbans değerleri arasındaki fark kaydedilmiştir.

PAL aktivitesi, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan trans-sinamik asit solüsyonunun 290 nm'de ölçülmesi sonucu elde edilen linear standard grafi yorumlanması ile belirlenen molar absorpsiyon katsayısının ($10900 \text{ litre mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılması ile hesaplanmıştır. PAL aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak nmol sinamik asit mg^{-1} protein saat^{-1} olarak ifade edilmiştir.

$$A = Ecl$$

A : Absorbans (290 nm).

c : Sinamik asit konsantrasyonu (Mol/L).

l : Işığın geçiş uzunluğu (1 cm).

E: Molar absorpsiyon katsayısı

Bir unite PAL aktivitesi 0.01 $A_{290} \text{ saat}^{-1}$ olarak alınmış ve bu değer 2.74 nmol trans-sinamik asite tekabül etmiştir (Dikilita, 2003).

Protein belirlenmesi

Örneklerdeki protein konsantrasyonu Coomassie blue boya reaksiyon yöntemi ile Bradford (1976)'ya göre yapılmıştır. Standard protein çözeltisi farklı

konsantrasyonlardaki BSA (bovine serum albumin) kullanarak hazırlanan standard grafiğe karşı okuma yapılarak elde edilmiştir.

Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar Sigma ve Fisher kimya şirketlerinden temin edilmiştir.

statistik Analizi

Araştırma verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 16.0 paket programı kullanılmıştır. Kontrol grubu ile *V. dahliae* ile inokule edilen gruplar arasındaki farklılığın önemli olup olmadığını ANOVA yöntemi ile test edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yonca yapraklarından elde edilen PAL enzimi amonyum sulfat ve Sephadex G-100 jel filtrasyon yöntemleri ile kademeli olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma enzimin aktivitesini artırmış, saflaştırılan proteinlerin enzim aktiviteleri ölçülerek ham ekstraktan elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır (Çizelge 1). *V. dahliae* ile inokule edilen bitkiler, kontrol grubu ile kıyaslandığında PAL aktivitesi istatistik olarak önemli bir artış göstermiştir ($p < 0.05$), fungus inokulasyonu sonucu bitkide savunma enzimlerinin ilk basamağını oluşturan PAL aktivitesinin yüksek düzeyde sentezlenmesine yol açmıştır. Önceki çalışmalardan elde edilen bilgilere göre Vertus çeidi dayanıklı bir çeşit olarak rapor edilmiştir (Dikilita, 2003). Solgunluk hastalığına dayanıklı çeşitlerin *Verticillium* türlerine karşı geliştirdikleri savunma mekanizması ve metabolitleri Bollwell ve ark. (1985), Smith (1996), Tang (2001), Dikilita (2003) ve Eldeen ve ark. (2010) çalışmalarında detaylı olarak açıklanmıştır.

Bu çalışmada sadece saflaştırılmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinden, kontrol grubu ile ilgili saflaştırma çalışması yapılmamıştır. Amonyum sulfat çöktürmesi ile yapılan saflaştırma bir çok çalışmada geniş yer tutmuş ve proteinlerin izolasyonunda ilk basamak olarak kayda geçmiştir (Tang, 2001; Hu ve ark., 2012). Çöktürme sonucu, proteinlerin diyaliz edilmesi ve enzim aktivitelerini engelleyecek mineral madde ve iyonların ortamdaki uzaklaştırılması ile aktivite ölçümünde artış kaydedilmiştir (Çizelge 1). Benzer sonuçlar Civello ve ark. (1995) ve Zia ve ark. (2011) tarafından da rapor edilmiştir. PAL aktivitesindeki artış, protein konsantrasyonundaki artış ile paralellik göstermiş ve bu durum spesifik aktiviteye yansımıştır. Saflaştırılmadan dolayı aktivitesi düşük olan ve iyonlar ve tuzlar gibi aktiviteyi perdeleyen kısımlar uzaklaştırıldığından PAL aktivitesinin inokule edilmiş bitkilerdeki durumu daha net ortaya konmuştur. Amonyum ve jel filtrasyon yolu ile saflaştırma derecesi artarken (1.75 ve 1.97), elde edilen ürün miktarında da kayıp yaşanmıştır (%75 ve %60). Ancak amonyum sulfat çöktürmesi ile elde edilen spesifik enzim aktivitesindeki artış (71.62 EÜ mg⁻¹ protein) ile jel filtrasyon yöntemi ile elde edilen spesifik enzim aktivitesindeki artış (80.48 EÜ mg⁻¹ protein) ham ekstraktan elde edilen spesifik aktivite ile kıyaslandığında (40.81 EÜ mg⁻¹ protein) oldukça yüksek bulunmuştur.

Enzim saflaştırılması ile aktivite artışı sağlanmış olup, bu tip çalışmalar hem enzim aktivitelerinin düşük olduğu durumlarda ya da birden fazla stres faktörünün bitki üzerinde etkili olduğu durumlarda aktiviteler arasındaki farkı belirlemek, ve stres faktörlerine karşı bitkilerin geniş spektrumlu stres ile ilgili protein miktarını yoksa ayrı ayrı spesifik bir proteinin miktarını sentezlendiği konusunda önemli bilgi aktaracaktır.

Çizelge 1. *Verticillium dahliae* ile inokule Edilen Yonca Bitkilerinden Elde Edilen PAL Enziminin Amonyum Sülfat ve Jel Filtrasyon Yöntemi ile Kademeli Olarak Saflaştırılması

Saflaştırma kademeleri	Aktivite (EÜ ¹ ml ⁻¹)	Toplam hacim (ml)	Protein kont. (mg ml ⁻¹)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ mg ⁻¹)	Ürün (%)	Saflaştırma katsayısı
Kontrol-Ham ekstrakt ²	12	94	0.43	40.42	1128	27.90	100	1
<i>V. dahliae</i> -Ham ekstrakt	20	98	0.49	48.02	1960	40.81	100	1
<i>V. dahliae</i> -(NH ₄) ₂ SO ₄	53	28	0.74	20.72	1484	71.62	75	1.75
<i>V. dahliae</i> -Sephadex G-100	132	09	1.64	14.76	1188	80.48	60	1.97

¹EÜ: Enzim ünitesi, ²Kontrol grubunda saflaştırma işlemleri yapılmamıştır.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, *V. dahliae* ile inokule edilen yonca bitkilerinden izole edilen PAL enzimi amonyum sulfat ve jel filtrasyon yöntemi ile kademeli olarak saflaştırılmış, artan protein konsantrasyonu ile enzim aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Burada asıl amaç, saflaştırma sonucu farklı seviyelerdeki proteinlerin aktivitelerini ölçerek,

gruplar arasındaki farklılığı ortaya koymaktır. Bu tip çalışmalar hem enzim aktivite değerlerinin birbirine yakın olduğu durumlarda hem de spesifik proteinlerin belirlenmesinde önemlidir. Ayrıca, bitki üzerinde birden fazla stres faktörünün etkili olduğu durumlarda da ilave stresin oluşturduğu muhtemel enzim veya protein sentezi de saflaştırma yöntemi ile belirlenebilir. Böylece, sadece kuraklık, tuzluluk veya hastalıklara

kararı dayanıklı olarak geli tirilen bitkilerin çoklu stres kar ısında dayanıklılıklarını kaybedip etmedikleri veya ilave protein sentezleyip sentezlemedikleri belirlenebilir.

TE EKKÜR

Bu çalı mada kullanılan orijinal fungal izolat Dr. Mike Milton (University of Wales, Swansea-UK), Dr. C.J. Smith (University of Wales, Swansea-UK) tarafından sa lanmı ve Dr. Murat Dikilita (Harran Üniversitesi) tarafından kültüre alınmı tır. Bu çalı mada kullanılan kimyasal maddeler ve yöntemler dı ndaki metot ve materyaller kritize edilmemi tır. Çalı manın bir kısmı University of Wales, Swansea-UK'de tamamlanmı tır.

KAYNAKLAR

- Bahadur, A., Singh, D. P., Sarma, B. K., Singh U. P. 2012. Foliar Application of l-Phenylalanine and Ferulic Acids to Pea Plants: Induced Phenylalanine Ammonia Lyase Activity and Resistance against *Erysiphe pisi*, Arch. Phytopathol and Plant Protec. 45:4, 398-403.
- Bolwell, G.P., Bell, J., Cramer, J., Schuch, W., Lamb, C.J., Dixon, R.A. 1985. L-Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Phaseolus vulgaris*. European J. of Biochem. 149:411-419.
- 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. 136:175-179.
- Civello, P.M., Arting, G.A., Chaves, A.R., Anan, M.C. 1995. Peroxidase from Strawberry Fruite by Partial Purification and Determination of some Properties. J. Agri. Food Chem. 43(10): 2596-2601.
- Dikilitas, M. 2003. Effect of Salinity & its Interactions with *Verticillium albo-atrum* on the Disease Development in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Lucerne (*Medicago sativa* & *M. media*) Plants. Ph.D. Thesis, University of Wales, Swansea, UK.
- Eldeen, D., Radwan, M., Fayez, K.A., Mahmoud, S.Y., Lu, G. 2010. Modifications of Antioxidant Activity and Protein Composition of Bean Leaf due to Bean Yellow Mosaic Virus Infection and Salicylic Acid Treatments. Acta Physiol Plant., 32:891-904.
- El-Shora, H.M. 2002. Properties of Phenylalanine Ammonia Lyase from Marrow Cotyledons. Plant Science 162: 1-7.
- Hammerschmidt, R. 1999. Induced Disease Resistance: how do Induced Plants Stop Pathogens. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55:77-84.
- Hu, Y., Wu, J., Luo, P., Mo, Y. 2012. Purification and Partial Characterization of Peroxidase from Lettuce Stems. Afr. J. Biotechnol., 11(11): 2752-2756.
- Latunde-Dada AO, Dixon RA & Lucas JA. 1987. Induction of Phytoalexin Biosynthetic Enzymes in Resistant and Susceptible Lucerne Callus Lines Infected with *Verticillium albo-atrum*. Physiol. Mol. Plant Pathol 31: 15-23.
- Levin, A.G., Lavee, S., Tsrer (Lahkim), L. 2003. Epidemiology of *Verticillium Dahliae* on Olive (cv. Picual) and its Effect on Yield Under Saline Conditions Plant Pathology, 52: 212-218.
- Mohammadi, A.H., Banihashemi, Z., Maftoun, M. 2007. Interaction Between Salinity Stress and *Verticillium Wilt* Disease in three Pistachio Rootstocks in a Calcareous Soil. J. Plant Nutr. 30: 241-252.
- Palmero, D., De Cara, M., Moreno, M.M., Iglesias, C., Tello, J.C. 2010. Stimulation of Mycelial Growth of Pathogenic and Seabed Isolates of *Fusarium Oxysporum* in Presence of Salts Afr. J. Microbiol. Res. 4(17):1859-1861.
- Smith, C.J. 1996. Accumulation of Phytoalexins: Defence Mechanism and Stimulus Response System. New Phytologists, 132:1-45.
- Tang, M. 2001. Elicitor-Induced Defence Responses and Mechanisms of Signal Transduction in *Medicago sativa* L. Ph.D. Thesis, University of Wales, Swansea.
- Turco, E., Naldini, D., Ragazzi, A. 2002. Disease Incidence and Vessel Anatomy in Cotton Plants Infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* under Salinity Stress. J. Plant Dis. Protec. 109 (1): 15-24.
- Turco, E., Vizzuso, C., Franceschini, S., Ragazzi, A., Stefanini, F.M. 2007. The in Vitro Effect of Gossypol and its nteraction with Salts on Conidial Germination and Viability of *Fusarium Oxysporum* sp. *Vasinfectum* solates. J. Appl. Microbiol. 103: 2370-2381.
- Zia, M.A., Kousar, M., Ahmed, I., Iqbal, H.M.N., Abbas, R.Z. 2011. Comparative Study of Peroxidase Purification from Apple and Orange Seeds. Afr. J. Biotechnol. 10(33): 6300-630.