وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامــعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة تأثير البروتين المثبط لفعالية الرايبوسومات المستخلص من المزارع النسيجية لنبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* اتجاه الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض سقوط البادرات.

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من

متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

صحاري موفق محمود هدو

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

2016-2015

بإشراف

د. رباب مجيد عبد

أستاذ مساعد

د . مثنى محمد إبراهيم

أستاذ مساعد

1441 هـ

2019 م

1. المقدمـــة Introduction

هناك بعض النباتات لها القدرة على انتاج بروتينات متخصصة تعرف بالبروتينات المثبطة لفعالية الرايبوسومات Ribosome- inactivating protein (RIP) ويقوم النبات بانتاجها كاحدى الوسائل الدفاعية اتجاه المسببات المرضية المختلفة (Van Damme وآخرون،2001). إذ تمتلك هذه البروتينات القدرة على تثبيط الرايبوسومات في الخلايا المستهدفة من خلال عملها على البنية التركيبية للرايبوسوم وتكون الاضرار التركيبية الناجمة عن ذلك اضراراً لا يمكن إصلاحها، ومن المعلوم ان الرايبوسومات هي أماكن تصنيع البروتين في الخلية لذا فان أي خلل تركيبي فيها يؤدي الى حدوث تثبيط في عملية بناء البروتين في الخلية وبالتالي لن تكون قادرة على اداء وظائفها الحيوية (Endo وآخرون، 1987). ويتم ذلك عن طريق النشاط الانزيمي لهذه البروتينات والذي يكون بعدة اشكال منها قد يكون لها نشاط انزيمي من نوع N-glycosylase يعرف أيضا باسم rRNA-N-glycosylase الذي يستهدف الاواصر الكلايكوسيدية التي تربط القواعد النتروجينية ويعمل على كسرها، لذا تعتبر ذات نشاط انزيمي على مستوى RNA فتسمى RNase (Mock وآخرون، 1996). او قد يكون نشاطها على مستوى DNA فتسمى DNase او نشاط انزيمي من نوع phosphatase على مستوى النيوكلوتيدات (Chen وآخرون، 1996). وهنالك أنواع عديدة من البروتينات المثبطة لفعالية الرايبوسوم (RIP) المستخلصة من النباتات منها Abrin، Ricin، Saporins (Barbieri وآخرون، 2006 و Puri وآخرون، 2012).

يعد نبات القرنفل .*Dianthus caryophyllus* L احد افراد العائلة القرنفلية Caryophyllaceae، التي تضم اكثر من 300 نوع من نباتات حولية او معمرة عشبية اوشجيرية، وتنمو غالبيتها في نصف الكرة الشمالي ولاسيما جنوب اوربا او المنطقة الممتدة من اسيا الصغرى الى اليابان (Jurgens وآخرون، 2003). وتطلق تسمية القرنفلCarntion على نبات *Dianthus caryophyllus* واصنافه المزروعة وهجن *D. caryophyllus* مع الأنواع الأخرى لجنس *Dianthus*. ويضم القرنفل ثلاث أنواع رئيسية هي: الحولية Annual والاحواض Border ودائم الازهار Perpetual-flowering (Anonymous، 2006). ويتم اكثاره اما بالبذور او خضريا بالعقل (الحيصة وآخرون، 2007). ويعد من النباتات التي لها استعمالات طبية كثيرة لما يحتويه من مواد فعالة وزيوت طيارة ومنها Eugenol الذي يتميز بخصائصة العلاجية الكثيرة (Abberton، 2007). بينت العديد من الدراسات ان لمستخلص نبات القرنفل

فعالية تثبيطية اتجاه العديد من المسببات المرضية للنبات ومنها الفطريات كالفطر الممرض *Rhizoctonia solani*، الذي يعد من الفطريات الممرضة للنباتات الموجودة بالتربة والذي يمتلك قدرة هائلة على مهاجمة طيف واسع من النباتات ويسبب امراضاً عديدة كامراض التعفن وذبول البادرات (Sharma وآخرون،2018). ويصيب الثمار التي تكون قريبة من سطح التربة (يوسف،2004 وشريف،2012). كما يسبب امراض اللفحة وتعفن الثمار المخزونة كمرض عفن البطاطا الجاف (يوسف، 2004). يعتبر الفطر *R. solani* من اسرع المسببات قتلا للعائل اذ يتميز بانتاجه العديد من الانزيمات والسموم التي تكون مسؤولة عن ظهور الاعراض وتدهور الإصابة بالمرض (Bertagnolli وآخرون، 1996).

لذا هدفت الدراسة الحالية الى:

1- استخلاص البروتين المثبط لفعالية الرايبوسوم من مزارع الكالس وأوراق نبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* L.

2- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من البروتين المثبط لفعالية الرايبوسوم المستخلص في نمو مزارع الفطر الممرض *Rhizoctonia solani*.

3- دراسة التغيرات المظهرية والكيميائية للفطر نتيجة للمعاملة بالبروتين المثبط لفعالية الرايبوسوم.

4- دراسة انواع الاحماض الامينية في محتوى مزارع الفطر *Rhizoctonia solani* المدعم بتراكيز من البروتين RIP.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مختبر زراعة الخلايا والانسجة النباتية ومختبر الفطريات التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة بجامعة ديالى خلال المدة من أيلول / 2018 ولغاية أيار /2019، بهدف دراسة تأثير البروتين المثبط لفعالية الرايبوسومات المستخلصة من المزارع النسيجية والأوراق الحقيقية لنبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* اتجاه الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض سقوط البادرات. بأستحثاث الكالس من الجزء الورقي المتصل بالساق لنبات القرنفل، اذ تم استحثاث الكالس على وسط MS مدعم بتراكيز 0.0 و0.5 و1.0 و 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-Dichloro phenoxy Actic Acid (2,4-D) إشارت النتائج الى ان اعلى وزن طري والبالغ 0.4500 غم عند التراكيز 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من2,4-D . وتم الاستحثاث الكالس على وسط MS مدعم بتراكيز 0.0 و0.5 و1.0 و 2.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخل مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA اذ بينت النتائج ان اعلى وزن طري والبالغ 0.2400 غم عند التركيز1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخل مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من Benzyl adenine (BA) . وتم الاستحثاث على وسط MS مدعم بتراكيز 0.0 و1.0 و2.5 و3.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من 2,4-D متداخل مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kin . أشارت النتائج الى ان اعلى وزن طري والبالغ 0.5000 غم عند التركيز 2.5 ملغم . لتر$^{-1}$ من2,4-D متداخل مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من Kinetin (Kin). وأشارت نتائج الاختبار عدة الأوساط للادامة ان افضل وسط لنمو مزارع الكالس كان على وسط MS المدعم بتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من Naphthalene acetic acid (NAA) متداخلا مع 0.5 ملغم. لتر$^{-1}$ من Thidiazuron (TDZ). اشارت الدراسة الى إمكانية عزل وتشخيص الفطر *R. soloni* من درنات البطاطا، واظهرت النتائج القابلية الامراضية لها بدلالة انخفاض قيمة الانبات ونسبة موت البادرات قبل البزوغ والبالغة (50 و50) % على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة. أظهرت نتائج استخلاص بروتين المثبط لفعالية الرايبوسومات Ribosome-inactivating protein (RIP) من الأوراق الحقيقية ومن مزارع الكالس النسيجية ومزيجهما لنبات القرنفل *Dianthus caryophyllus* ، اعطت المزارع النسيجية اعلى تركيز من البروتين والبالغ 388.25 ملغم/لتر بالمقارنة بالبروتين المستخلص من الأوراق الحقيقية والبالغ 175.33 ملغم/لتر. أظهرت نتائج معاملة الفطر *R.soloni* بتراكيز مختلفة (0.25، 0.50 ملغم/لتر) من البروتين RIP تثبيط نمو الفطر خلال مدة الحضن إذ بلغ معدل

قطر مستعمرة الفطر النامي على وسط PDA المدعم بتراكيز 0.25، 0.50 ملغم/لتر من البروتين RIP المستخلص من الأوراق الحقيقية 1.0، 0.6 سم على التوالي بعد 72 ساعة بالمقارنة ب 9 سم لمعاملة المقارنة بينما كان معدل قطر المستعمرة 2.3 و2.5 سم بعد 72 ساعة في معاملات التراكيز 0.25، 0.50 ملغم/لتر للبروتين RIP المستخلص من المزارع الكالس، في حين بلغ قطر المستعمرة 2.0، 3.0 سم عند استعمال التراكيز ذاتها من البروتين RIP الناتجة من دمج النوعين المستخلصين من الأوراق ومزارع الكالس، الامر الذي انعكس بالنتيجة على بيانات الوزن الرطب والوزن الجاف المسجلة للفطر *R.soloni* ، والتي اظهرت انخفاض واضح في الاوزان الطرية والجافة للكتلة الحيوية للفطر في جميع الفترات الزمنية ولجميع التراكيز من البروتين RIP. وأشارت النتائج الى ان اعلى نسبة مئوية لقياس الاحماض الامينية للبروتين المستخلص من الكالس كان 14.70% عند التركيز 0.25 ملغم/لتر واقل نسبة 1.23% عند التركيز 0.50 ملغم/لتر، والى اعلى نسبة مئوية من الأوراق كانت 20.01% عند التركيز 0.50 ملغم/لتر واقل نسبة 2.05% عند التركيز 0.50 ملغم/لتر، واعلى نسبة مئوية لمزيجهما كانت 14.71% عند التركيز 0.25 ملغم/لتر واقل نسبة 1.58% عند التركيز 0.25 ملغم/لتر. أظهرت نتائج الفحص المجهري لمزارع الفطر النامية على وسط Potata Dextrose Agar (PDA) المدعم بتراكيز مختلفة من البروتين RIP انخفاض في معدل قطر الخيط الفطري وحصول تشوهات في اطراف الخيط وتحلل في بعض مناطق الجدران الخلوية للخيط الفطري وحصول انبعاجات وعدم استقام للخيط الفطري فضلاً عن ظهور الاجسام البرميلية. أشارت نتائج تحليل محتوى الفطر من الاحماض الامينية الى حصول زيادة مجموع تراكيز الاحماض الامينية في مزارع الفطر النامية على وسط PDA المدعم بتراكيز مختلفة من البروتين RIP بالمقارنة بمعاملة المقارنة المستعملة بمزارع الفطر النامية على وسط PDA الذي لم يدعم بالبروتين .