



جامعة دمشق  
كلية الهندسة الزراعية  
قسم وقاية النبات

عزل وتنسيل وتعبير مورثة *Hrp N* من البكتيريا *Erwinia amylovora* وتقييم  
فعالية الهاربين بتحريض بعض ردود الفعل الدفاعية على نبات القمح

**Cloning the *HrpN* gene from *Erwinia amylovora* and  
evaluating of Harpin efficiency in stimulating of some wheat  
defense response**

أطروحة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية

( وقاية النبات )

إعداد المهندس:

إسماعيل محمد الصالح

بإشراف

د.عروب المصري

أ.د.محمود أبو غرة

باحث مساعد

أستاذ في قسم وقاية النبات

الهيئة العامة للتقانة الحيوية - دمشق

كلية الزراعة - جامعة دمشق

2024-2023

## قرار لجنة الحكم

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراة في الهندسة الزراعية / اختصاص وقاية النبات من كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق، وأجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the degree of PHD in Plant protection at the Faculty of Agriculture, Damascus University, Referee committee has approved the thesis..

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2023/11/29.

## أمام لجنة الحكم

أ.د. محمد محمد

أستاذ في قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة – جامعة دمشق (عضواً)

أ.د. زكريا الناصر

أستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة – جامعة دمشق (عضواً)

أ.د. محمود أبو غرة

أستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة – جامعة دمشق (عضواً مشرفاً)

د. أنطونيوس داود

باحث في الهيئة العامة للطاقة الذرية (عضواً)

د. نزار عيسى

أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية / كلية العلوم - جامعة دمشق (عضواً)

## تصريح

أُصرّح بأنّ هذا البحث " عزل وتنسيل وتعبير مورثة *Hrp N* من البكتيريا *Erwinia amylovora* وتقييم فعالية الهاربين بتحريض بعض ردود الفعل الدفاعية على نبات القمح " لم يسبق أن قدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وأنّ كل العمل، والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرف والمشارف المشارك، وجميع المراجع التي ذكرت في هذه الرسالة نسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

## المُرشّح

إسماعيل محمد الصالح

## DECLARATION

This is to declare that, this work " **Cloning the HrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluating of Harpin efficiency in stimulating of some wheat defense response**" Is a new research work, and has neither been already accepted for any degree, no has been submitted concurrently for any other degree. All the mentioned results are my own efforts and done by direct supervision of my guides, all the referred literature are cited, and well-documented in the list of reference.

## Candidate

Ismaeel alsaleh

## شهادة

نشهد بأن العمل المُقدم في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قام به المُرشح إسماعيل محمد الصالح بإشراف الدكتور محمود أبو غرة (المشرف) الأستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة – جامعة دمشق وبمشاركة الباحثة المساعدة الدكتورة عروب المصري من الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وأن المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص.

المشرف المشارك

د.عروب المصري

المشرف

أ.د.محمود أبو غرة

المُرشح

إسماعيل الصالح

## CERTIFICATION

We witness that the described work in this thesis is the result of scientific research conducted by the candidate Ismaeel Mohammad alsaleh, under supervision of Dr. Mahmoud Abu-ghorra at the department of plant protection and sub-supervision Dr. Aroub almasri assistant researcher at National commission for biotechnology, and any reference of other researchers work has been duly acknowledged in the text.

**Candidate**

**Ismaeel alsaleh**

**Supervision**

**Mahmoud Abu-ghorra**

**Co-supervision**

**Aroub almasri**

## شكر

الحمد والشكر لله في الأول والآخر، بدايةً أتقدم بالشكر والعرفان لجامعة دمشق وكلية الهندسة الزراعية وللسادة المشرفين الأستاذ الدكتور محمود أبو غرة والدكتورة عروب المصري على لقبولهما بالإشراف على هذه الأطروحة وتقديم خبراتهم العلمية والعملية في سبيل إتمام وإنجاز العمل، والشكر موصول للدكتورة عائدة جلول لإسهامها الكبير والفعال في هذا البحث، كم أتقدم بالشكر للسادة أعضاء لجنة الحكم الموقرة الأستاذ الدكتور محمد محمد والأستاذ الدكتور زكريا الناصر والأستاذ الدكتور محمود أبو غرة والباحث الدكتور أنطونيوس داود والأستاذ الدكتور نزار عيسى على جهودهم المبذولة في التدقيق والتصويب وطلب تعديلات من شأنها إخراج الأطروحة بأفضل شكل، والشكر والامتنان الكبير للهيئة العامة للتقانة الحيوية على جميع ما قدمته من مواد وتجهيزات متوفرة لولاها لما أمكن متابعة العمل في البحث.

وفي النهاية شكراً لجميع أصدقائي وزملائي في العمل الذين قدموا جميع أشكال الدعم أثناء إنجاز العمل والشكر الكبير لعائلتي أمي الحبيبة وأخوتي الأعزاء وزوجتي الغالية وأميرتي الصغيرة إيفا على مساندتهم ودعمهم غير المحدود طيلة فترة دراستي ... شكراً لكم جميعاً.

## الملخص

أجري البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية- كلية الزراعة، ومخبر البيولوجيا الجزيئية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، استخدم في هذه الدراسة بروتين الهاربين المؤشب Harpin<sub>Ea</sub> مصدره الأساسي بكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة للفة النارية على التفاحيات، حيث أجري تنسيل المورثة *HrpN* المسؤولة عن إنتاج البروتين في هيئة الطاقة الذرية إلى البلاسميد Pmal C2، بعد تعديله أدخل إلى سلالة التحوير *Escherichia coli* DH5α. أجريت اختبارات التأكد من صحة الإدخال ومن ثم عزلت البلاسميدات المحورة وأدخلت إلى سلالة التعبير *E.coli* BL21، وتم الحصول على البروتين الكلي الذي أجري تنقية بروتين الهاربين منه باستخدام عمود amylose resin.

اختبرت نقاوة الهاربين المنتج وقيست تراكيزه باستخدام الرحلان على هلام SDS-PAGE، وظهر بالرحلان حزمة واضحة ذات وزن جزيئي تقديري 44 كيلو دالتون وهو الوزن الجزيئي لبروتين الهاربين الخاص بـ *E. amylovora*. كما اختبرت الثباتية الحرارية للهاربين باعتبارها إحدى أهم صفات الهاربين، حيث عرض بروتين الهاربين لدرجات حرارة مختلفة (30، 45، 60، 70، 80) س لخمس دقائق، بعدها حقن في أوراق التبغ بعد تبريده لدرجة حرارة الغرفة، وروقت ردة فعل فرط الحساسية على التبغ، حيث أظهرت النتائج ظهور ردة فعل فرط حساسية على أوراق التبغ مما يدل على الثباتية الحرارية للبروتين.

طبق بروتين الهاربين Harpin المؤشب على بادرات قمح بعمر 10 أيام، لدراسة تأثيره في تحفيز المقاومة في القمح من خلال قياس فعالية أنزيم superoxide dismutase (SOD) واستخدم الماء المقطر المعقم كشاهد، أخذت العينات بعد الرش على أزمنة متعددة (0، 1، 2، 4، 18، 24، 48، 72، 96) ساعة وحفظت في التجميد على - 70 س لحين إجراء الاختبارات، حيث عزل البروتين الكلي من العينات المحفوظة على شكل خلاصات بروتينية وقدرت تراكيزها بطريقة برادفورد، ومن ثم قيسست الفعالية الأنزيمية لأنزيم سوبركسيد دسموتاز Superoxide dismutase (SOD) بواسطة جهاز المطياف الضوئي، وأظهرت النتائج زيادة فعالية أنزيم SOD في بادرات القمح المعاملة ببروتين الهاربين مقارنة بالمعاملة بالماء المقطر؛ فبدأت الزيادة الملحوظة في فعالية الأنزيم من الساعة الـ 18 بعد الرش، وازدادت الفعالية حتى بلغت أعلى تركيز للأنزيم بعد 96 ساعة من الرش حيث وصلت إلى 2.68 مرة من تركيز الأنزيم في عينات الشاهد، كذلك أجري رحلان Native-PAGE للعينات المعاملة بالهاربين والمعاملة بالماء للأزمنة المختلفة وكشف عن الأنزيم عن طريق الحزم الشفافة التي تظهر نتيجة منافسة الأنزيم لـ Nitro Blue Tetrazolium (NBT) وبينت النتائج ازدياد كثافة هذه الحزم في العينات المعاملة بالهاربين لأزمنة حصاد 18، 24، 48، 72، 96 ساعة بعد الرش مقارنة بالعينات المعاملة بالماء لهذه الأزمنة والتي بقيت كثافتها على نفس الدرجة تقريباً، كما درس التعبير المورثي لمورثة zn-SOD ولمورثة الأكتين كشاهد داخلي عن طريق إجراء rt-PCR والرحلان على هلام الأغاروز، وكانت النتائج مؤكدة لما سبق حيث تزايدت كثافة حزم الـ zn-SOD في العينات المرشوشة بالهاربين تدريجياً في العينات، وكانت أعلى كثافة حزمة عند زمن حصاد 96 ساعة بعد المعاملة بالهاربين مقارنة بالشاهد المعامل بالماء، أما تعبير

مورثة الاكتين بقي كما هو تقريباً في العينات المعزولة من نباتات القمح سواء المعاملة بالهاريين أو المعاملة بالماء، مما يدل بأن أنّ لبروتين الهاريين فعالية على تحريض أنزيم الـ SOD على مستوى النسخ أي أنه أدى لزيادة التعبير عن المورثة المسؤولة عن أنزيم الـ SOD.

كذلك قيمت كفاءة رش بادرات القمح ببروتين الهاريين المؤشب Harpin<sub>Ea</sub> في زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز (POD)، وذلك عن طريق قياس الفعالية الأنزيمية اعتماداً على طريقتي المطياف الضوئي والرحلان الكهربائي على هلامية متعدد الأكريل أميد (native-PAGE)، أظهرت نتائج القياس بالمطياف الضوئي زيادة في فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأنسجة النباتية لأوراق القمح المعاملة ببروتين الهاريين مقارنة بالمعاملة بالشاهد (الماء)، كانت الزيادة تدريجية وبلغت أعلى تركيز للأنزيم بعد 72 ساعة بعد معاملة الرش بالهاريين مقارنة بالشاهد حيث بلغت 1.828 ضعف معاملة الشاهد، ثم انخفضت قليلاً في الزمن 96 ساعة بعد الرش، وأكد ذلك الكشف عن فعالية أنزيم POD عن طريق إجراء رحلان كهربائي متعدد الأكريل أميد (Native-PAGE) للخلاصات البروتينية للعينات المدروسة، فبينت نتيجة الرحلان ازدياد كثافة وشدة حزم البيروكسيداز تدريجياً في العينات المعاملة بالهاريين ووصلت لأعلى فعالية (أعلى كثافة وشدة للحزمة الناتجة) في الزمن 72 ساعة بعد الرش ثم انخفضت كثافة الحزمة قليلاً في زمن الحصاد 96 ساعة بعد المعاملة، كما أجريت دراسة للتعبير المورثي لمورثة *GPX* إحدى المورثات المسؤولة عن أنزيم البيروكسيداز وقورنت بتعبير مورثة *Taβ-actin* (الشاهد الداخلي) على هلامية الأغاروز، وأظهرت النتائج ثباتية نسبية في التعبير مع الزمن لكلا المورثتين سواء في بادرات القمح المعاملة بالماء أو البادرات المعاملة ببروتين الهاريين أي لم يظهر تأثير لمعاملة القمح ببروتين الهاريين على التعبير المورثي لمورثة *GPX*، مما يدل على أن تأثير بروتين الهاريين بتحريض إنتاج أنزيم البيروكسيداز ليس على مستوى النسخ، وربما هناك مورثات أخرى تلعب دوراً في زيادة نشاطه .

كما درس تأثير الهاريين في رفع تركيز الفلافونيدات الكلية بطريقة كلوريد الألومنيوم اللونية، وتبين ازدياد التركيز عند المعاملة بالهاريين حتى بلغ ضعف التركيز تقريباً في معاملة الشاهد عند زمن حصاد 96 ساعة بعد المعاملة.

كذلك قيم تأثير بروتين الهاريين في نمو نبات القمح، حيث أخذت قراءات نسبة الإنبات وطول الجذير والسويقة وعدد الجذور والوزن الرطب والجاف وتركيز الكلورفيل في البادرات كمؤشرات أولية لقوة النمو؛ وبينت التجربة وجود تأثير معنوي للهاريين في طول الجذير والسويقة في بادرات القمح بعمر أسبوع (153.95 ، 170.03) مم على التوالي مقارنةً بالشاهد الماء (102.27 ، 131.84) مم، ورافق زيادة الطول للسويقة والجذير زيادة معنوية في متوسط الوزن الرطب والجاف لبادرات القمح المعاملة بالهاريين حيث كان (1.20 ، 1.27) على التوالي ضعف الوزن الرطب والجاف للبادرات المعاملة بالشاهد الماء، وبنفس الوقت ازدادت كمية اليخضور معنوياً من 11.2 مغ / غ نبات في الشاهد إلى 14.2 مغ / غ في البادرات المعاملة بالهاريين.

من جهة أخرى قيم تأثير بروتين الهاريين في تحفيز مقاومة القمح لمرض عفن جذور القمح واستخدمت عزلات ممرضة تنتمي للأجناس (*Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*) لعدوى الصنف بحوث 5 القابل للإصابة بالمرض، وقورن الهاريين بالماء كشاهد أول ومعقم البذار دايفنكونازول كشاهد ثانٍ.

أظهرت النتائج أن بروتين الهاربين أعطى فعالية بتحفيز مقاومة القمح للإصابة بأعفان الجذور الثلاثة المدروسة مقارنة بالشاهد الماء وكانت فعاليته ضد فطر *Fusarium* مماثلة لمعقم البذار دايفنكونازول (درجة إصابة = 0)، وتفوق على معقم البذار المستخدم عند العدوى بالفطر *Pythium* حيث معاملة الهاربين أدت لدرجة إصابة = 0 بينما معاملة معقم البذار أظهرت درجة إصابة = 1، بينما كان المعقم أفضل منه عند العدوى بالفطر *Rhizoctonia*.

وأخيراً دُرست فعالية بروتين الهاربين في الحد من إمراضية بكتيريا تخطط الأوراق البكتيري على القمح *Xanthomonas translucens*، استخدم في الدراسة عزلتين للمرض Xt10 و Xt4.2 والصنف شام 6 القابل للإصابة. أظهرت معاملة الهاربين انخفاض في نسبة شدة الإصابة بالعزلتين إلى (14.8، 13.2) % على التوالي مقارنةً بالشاهد؛ حيث بلغت نسبة شدة الإصابة بالعزلة Xt10 6.4% في بادرات القمح المعاملة بالهاربين مقارنةً بالشاهد الذي بلغت فيه نسبة شدة الإصابة 43.2%، بينما بلغت في البادرات المعدية بالعزلة Xt4.2 (5.2، 39.2) % بالنسبة للبادرات المعاملة بالهاربين والماء على التوالي، اقترن انخفاض شدة الإصابة بالعزلتين بانخفاض في النمو البكتيري في الأنسجة؛ حيث بدأ الانخفاض في التعداد البكتيري للعزلتين بعد 72 ساعة من العدوى فكان التعداد أقل بـ 50 مرة في النباتات المعاملة بالهاربين مقارنةً بالشاهد للعزلة Xt10 و أقل بـ 120 مرة بالنسبة للعزلة Xt4.2 واستمر انخفاض التعداد البكتيري لبعده 99 ساعة من العدوى بالعزلتين الممرضتين Xt10 و Xt4.2، وبذلك يكون بروتين الهاربين قد أثبت فعالية في الحد من إمراضية وتخطط الأوراق البكتيري على القمح.

## فهرس المحتويات

| الصفحة | العنوان                                                   |
|--------|-----------------------------------------------------------|
| I      | فهرس المحتويات                                            |
| III    | فهرس الجداول                                              |
| IV     | فهرس الأشكال                                              |
| VI     | الاختصارات Abbreviations                                  |
| 1      | الفصل الأول المقدمة Introduction                          |
| 5      | - الإشكالية البحثية Research Problem                      |
| 5      | - تساؤلات البحث Research Questions                        |
| 6      | - فرضيات البحث Research Hypotheses                        |
| 6      | - مسلمات البحث Research Postulates                        |
| 7      | - أهداف البحث Research Objectives                         |
| 7      | - أهمية البحث Research Importance                         |
| 8      | - محدوديات البحث Research Limitations                     |
| 9      | - مبرارت البحث Research Justification                     |
| 9      | - مصطلحات البحث                                           |
| 11     | الفصل الثاني: الدراسة المرجعية Literature review          |
| 12     | 1-2 أعفان جذور القمح الشائعة                              |
| 13     | 2-2 مرض التخطط الشفاف على القمح                           |
| 16     | 3-2 ردة فعل فرط الحساسية Hypersensitive Response          |
| 17     | 4-2 المقاومة المستحثة Induced Resistance                  |
| 18     | 5-2 المقاومة الجهازية المكتسبة SAR                        |
| 19     | 6-2 محفزات المقاومة Resistance Elicitors                  |
| 20     | 7-2 الأنزيمات المتعلقة بردود الفعل الدفاعية               |
| 20     | 1-7-2 أنزيم السوبركسيد دسموتاز (SOD) superoxide dismutase |
| 22     | 2-7-2 أنزيم البيروكسيداز (POD) Peroxidase                 |
| 23     | 8-2 بروتين الهاربين Harpin                                |
| 25     | 1-8-2 دور الهاربين كمحرّض لفرط الحساسية HR                |
| 26     | 2-8-2 دور الهاربين في تحريض ردود الفعل الدفاعية في النبات |
| 28     | 3-8-2 دور الهاربين في تعزيز نمو النبات                    |
| 29     | 9-2 تنسيل مورثة الهاربين <i>HrpN</i>                      |
| 33     | الفصل الثالث: مواد البحث وطرائقه Materials and Methods    |
| 34     | 1-3 موقع إجراء البحث                                      |
| 34     | 2-3 المادة النباتية                                       |
| 34     | 3-3 المحفز المدروس                                        |
| 34     | 4-3 تنسيل مورثة الـ <i>HrpN</i>                           |

|    |                                                                                      |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 36 | 5-3 تنقية بروتين الهاربين                                                            |
| 37 | 6-3 دراسة خصائص بروتين الهاربين المؤشب                                               |
| 39 | 7-3 تقييم كفاءة بروتين الهاربين المؤشب المنقى في تحريض أنزيم الـ SOD في القمح        |
| 39 | 1-7-3 استخلاص البروتينات الكلية وقياس تركيزها                                        |
| 40 | 2-7-3 دراسة فعالية أنزيم SOD باستخدام جهاز المطياف الضوئي                            |
| 41 | 3-7-3 دراسة فعالية أنزيم SOD عن طريق الرحلان الكهربائي العمودي native-PAGE           |
| 41 | 4-7-3 دراسة التعبير المورثي لمورثة الـ SOD                                           |
| 43 | 8-3 تقييم كفاءة بروتين الهاربين في تحريض فعالية أنزيم البيروكسيداز POD في القمح      |
| 43 | 1-8-3 دراسة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD بالمطياف الضوئي                            |
| 44 | 2-8-3 دراسة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD عن طريق native-PAGE                        |
| 45 | 3-8-3 دراسة التعبير المورثي لمورثة GPX إحدى المورثات المسؤولة عن أنزيم البيروكسيداز  |
| 46 | 9-3 تحديد تركيزات الفلافونويد الكلية                                                 |
| 47 | 10-3 التأثير في إنبات القمح ونموه                                                    |
| 47 | 11-3 تقييم الهاربين في تحريض مقاومة القمح تجاه مسببات مرض تعفن جذور القمح            |
| 48 | 1-11-3 التأثير في مقاومة القمح لعفن الجذور                                           |
| 49 | 12-3 تقييم فعالية بروتين الهاربين المؤشب في إمراضية بكتيريا التخطيط الشفاف على القمح |
| 49 | 1-12-3 اختبار القدرة الإمراضية للعزلات                                               |
| 50 | 2-12-3 الحد من الشدة المرضية لـ Xt في القمح                                          |
| 50 | 3-12-3 تقييم النمو البكتيري في الأوراق                                               |
| 52 | الفصل الرابع: النتائج والمناقشة Results and Discussion                               |
| 53 | 1-4 تسيل المورثة HrpN وتعبير البروتين                                                |
| 53 | 2-4 دراسة خصائص الهاربين المنتج                                                      |
| 54 | 3-4 تقييم كفاءة بروتين الهاربين المؤشب في تحريض أنزيم الـ SOD في القمح               |
| 54 | 1-3-4 استخلاص البروتينات الكلية وقياس تركيزها                                        |
| 57 | 2-3-4 قياس الفعالية أنزيم الـ SOD اعتماداً على المطياف الضوئي                        |
| 58 | 3-3-4 قياس فعالية أنزيم الـ SOD باستخدام الرحلان الكهربائي Native-PAGE               |
| 60 | 4-3-4 دراسة التعبير المورثي للمورثة SOD                                              |
| 63 | 4-4 دراسة كفاءة الهاربين المؤشب في تحريض فعالية أنزيم البيروكسيداز POD في القمح      |
| 63 | 1-4-4 قياس فعالية أنزيم POD اعتماداً على المطياف الضوئي                              |
| 65 | 2-4-4 قياس فعالية أنزيم الـ POD باستخدام الرحلان الكهربائي Native-PAGE               |
| 67 | 3-4-4 دراسة التعبير المورثي لمورثة GPX إحدى المورثات المسؤولة عن أنزيم البيروكسيداز  |
| 68 | 5-4 تقدير الفلافونيدات الكلية                                                        |
| 69 | 6-4 تأثير بروتين الهاربين في إنبات القمح ونموه                                       |
| 69 | 1-6-4 التأثير في قوة النمو                                                           |
| 71 | 2-6-4 حساب تركيز اليخضور                                                             |
| 71 | 7-4 التأثير في مقاومة القمح لأعفان الجذور الشائعة                                    |
| 73 | 8-4 تقييم فعالية بروتين الهاربين المؤشب في إمراضية بكتيريا التخطيط الشفاف على القمح  |
| 73 | 1-8-4 القدرة الإمراضية للعزلات                                                       |

|    |                                                                     |
|----|---------------------------------------------------------------------|
| 73 | 4-8-2 تأثير بروتين الهاربين في الحد من الشدة المرضية لـ Xt في القمح |
| 75 | 4-8-3 تقييم النمو البكتيري بطريقة العد البكتيري                     |
| 78 | الفصل الخامس: الاستنتاجات والتوصيات والمقترحات                      |
| 79 | 6- الاستنتاجات                                                      |
| 80 | 6-1 التوصيات والمقترحات                                             |
| 81 | الفصل السادس: المراجع العلمية                                       |
| 82 | 6-1 المراجع العربية                                                 |
| 83 | 6-2 المراجع الأجنبية                                                |

### فهرس الجداول

| رقم<br>الصفحة | العنوان                                                                                                           | رقم<br>الجدول |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 2             | مساحة وإنتاج وغلة القمح الطري حسب المحافظات لعام 2020                                                             | 1             |
| 3             | مساحة وإنتاج وغلة القمح القاسي حسب المحافظات لعام 2020                                                            | 2             |
| 24            | بروتينات الهاربين الموصفة في عدة أنواع بكتيرية ممرضة للنبات                                                       | 3             |
| 37            | مكونات هلامة متعدد الأكريلاميد اللازمة لإجراء رحلان SDS-PAGE                                                      | 4             |
| 40            | مكونات وكميات مواد التفاعل اللازمة لقياس فعالية أنزيم الـ SOD في الخلاصات البروتينية                              | 5             |
| 42            | التسلسلات النكليوتيدية للبادئات المستخدمة في دراسة التعبير المورثي لمورثي الـ zn-<br>SOD والـ Actin               | 6             |
| 43            | برامج الدورات الحرارية لتفاعلات الـ PCR المدروسة لتضخيم مورثي Zn-SOD و<br>Taβ – Actin                             | 7             |
| 45            | التسلسلات النكليوتيدية للبادئات المستخدمة في دراسة التعبير المورثي لمورثي الـ GPX<br>والـ Actin                   | 8             |
| 46            | برامج الدورات الحرارية لتفاعلات الـ PCR المدروسة لتضخيم مورثي GPX و – Taβ<br>Actin                                | 9             |
| 56            | متوسط تراكيز البروتين (ميكروغرام/ مل) في العينات المدروسة في معاملة الهاربين<br>ومعاملة الشاهد لكافة أزمنة الحصاد | 10            |
| 70            | تأثير معاملة بذار القمح بالهاربين في نمو السويقة والجذير وعدد الجذور                                              | 11            |

## فهرس الأشكال

| رقم<br>الصفحة | العنوان                                                                                                                                                                   | رقم<br>الشكل |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 12            | أهم أعراض أعفان جذور القمح الشائعة                                                                                                                                        | 1            |
| 14            | أعراض الإصابة المختلفة ببكتيريا التخطط البكتيري على القمح                                                                                                                 | 2            |
| 21            | مخطط تمثيلي لتفاعل أنزيم الـ SOD بأنواعه مع الأنثيون سوبراكسيد                                                                                                            | 3            |
| 23            | مخطط تمثيلي يبين دور أنزيم البيروكسيداز في ردود الفعل الدفاعية لدى النبات                                                                                                 | 4            |
| 23            | التركيب الكيميائي لبروتين الهاربين النقي                                                                                                                                  | 5            |
| 35            | الخريطة الوراثية للبلاسميد Pmal C2                                                                                                                                        | 6            |
| 36            | مخطط تمثيلي لكيفية التأكد من دخول البلاسميد المحور بموتة <i>HrpN</i> إلى السلالة <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$                                                              | 7            |
| 53            | بروتين الهاربين المؤشب Harpin <sub>ea</sub> بعد التنقية                                                                                                                   | 8            |
| 54            | a رحلان SDS-PAGE لبروتين الهاربين المدروس بالمقارنة مع معلم وزن جزيئي ملون، b فرط الحساسية على التبغ بعد الحقن ببروتين الهاربين المعرض لدرجات حرارة مختلفة                | 9            |
| 55            | تفاعل محلول برادفورد مع محاليل قياسية من ألبومين المصل البقري BSA مع تفاعل محلول برادفورد مع البروتين الكلي المعزول من عينات زمن حصاد 48 سا بعد المعاملة                  | 10           |
| 56            | المنحنى المعياري المرسوم والمعادلة الخطية للمحاليل المعيارية المدروسة لبعض الأزمنة المدروسة                                                                               | 11           |
| 57            | تدرج في التفاعل اللوني الحاصل من تفاعل الـ NBT مع انيون سوبركسيد نتيجة منافسة أنزيم الـ SOD للـ NBT                                                                       | 12           |
| 58            | مخطط قياس فعالية أنزيم الـ SOD مع الزمن في بادرات القمح المعاملة رشاً ببروتين الهاربين مقارنة بالمعاملة بالشاهد (الماء)                                                   | 13           |
| 59            | الرحلان الكهربائي لهلامة متعدد الأكريل أميد a: الخلاصات البروتينية للعينات المعاملة بالهاربين b: الخلاصات البروتينية للعينات المعاملة بالماء، لأزمنة الحصاد 0 إلى 96 ساعة | 14           |
| 60            | نباتات القمح المتروكة بدون سقاية لمدة أسبوع بعد حصاد العينات لجميع الأزمنة                                                                                                | 15           |
| 61            | رحلان عينات الـ RNA المعزولة من عينات القمح المعاملة بالهاربين (1-5) والعينات المعاملة بالشاهد الماء (6-10) على هلامة آغاروز 1% وذلك مقارنة بمعلم وزن جزيئي 100 pb (M)    | 16           |
| 62            | نتائج رحلان نواتج الـ PCR لعينات الـ cDNA العائدة للقمح المعامل بالهاربين (h) والشاهد (c) لأزمنة الحصاد المختلفة و المضخمة ببيادئات الأكتين                               | 17           |
| 62            | نتائج رحلان نواتج الـ PCR لعينات الـ cDNA العائدة للقمح المعامل بالهاربين (h) والعينات المعاملة بالماء (c) المضخمة بالبيادئات المتخصصة بالـ SOD                           | 18           |
| 64            | تدرج في التفاعل اللوني الحاصل من تفاعل الغاياكول guaiacol مع بيروكسيد الهيدروجين بوجود البيروكسيداز منتجاً التيتراغاياكول                                                 | 19           |
| 65            | مخطط قياس فعالية أنزيم الـ POD مع الزمن في بادرات القمح المعاملة بالهاربين مقارنة بالمعاملة بالشاهد (الماء)                                                               | 20           |
| 66            | فعالية الـ POD على هلامة native-PAGE للعينات المعاملة بالماء للأزمنة المختلفة بعد المعاملة                                                                                | 21           |

|    |                                                                                                                                                                  |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 22 | فعالية الـ POD على هلامة native-PAGE للعينات المعاملة بالهاريبين للأزمنة المختلفة بعد المعاملة                                                                   | 67 |
| 23 | نتائج رحلان نواتج الـ PCR لعينات الـ cDNA العائدة للقمح المعامل بالهاريبين (1-5) والشاهد (6-10) لأزمنة الحصاد المختلفة و المضخمة ببيادئات GPX                    | 68 |
| 24 | تراكيز الفلافونيدات الكلية في أوراق القمح صنف شام 3 المعاملة رشاً بالهاريبين مقارنة بالشاهد لأزمنة الحصاد المختلفة بعد المعاملة                                  | 69 |
| 25 | تأثير الهاريبين مقارنة بالدافنكونازول والماء في تحريض المقاومة لأعفان الجذور في القمح                                                                            | 72 |
| 26 | a: مستعمرات بكتيريا <i>X. translucens</i> على وسط نمو YPGA، b: أعراض اصفرار بعد العدوى الاصطناعية ببكتيريا <i>X. translucens</i> العزلة Xt10 على صنف القمح شام 6 | 73 |
| 27 | نسبة شدة الإصابة بعزلتين من بكتيريا التخطط الشفاف على بادرات القمح صنف شام 6 المعاملة بالهاريبين والمعاملة بالشاهد (الماء)                                       | 75 |
| 28 | النمو البكتيري للعزلة الممرضة Xt10 على أوراق القمح المعاملة بالهاريبين والشاهد الماء مع الزمن                                                                    | 76 |
| 29 | النمو البكتيري للعزلة الممرضة Xt4.2 على أوراق القمح المعاملة بالهاريبين والشاهد الماء مع الزمن                                                                   | 76 |

## Abberviations الاختصارات

| المختصر     | المصطلح                                                    |
|-------------|------------------------------------------------------------|
| ASA1        | anthranilate synthase                                      |
| Avr         | Averulance genes                                           |
| BABA        | $\beta$ -amino butyric acid                                |
| CFU         | Colony Forming Unit                                        |
| CPKs        | calcium-dependent protein kinases                          |
| EIN2        | Ethylene-insensitive 2                                     |
| EPS         | Exopolysaccharides                                         |
| GPX         | Glutathione Peroxidase                                     |
| HR          | Hypersensitive Response                                    |
| Hrp         | Hypersensitive Response and pathogenicity                  |
| IPTG        | Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside               |
| ISR         | induced systemic resistance                                |
| LAR         | Local acquired resistance                                  |
| LOX         | Lipoxygenase                                               |
| MAPK        | Mitogen-Activated Protein Kinase                           |
| Native-PAGE | native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis                  |
| NBT         | NitroBlueTetrazolium                                       |
| O.D         | Optical Density                                            |
| PAL         | phenylalanine ammonia-lyase                                |
| PAMPs       | Pathogen-associated molecular patterns                     |
| PCR         | Polymerase chain reaction                                  |
| PDA         | Potato Dextrose Agar                                       |
| PDB         | plant defense booster                                      |
| POD         | Peroxidase                                                 |
| PPO         | polyphenol oxidase                                         |
| PPRs        | Pattern recognition receptors                              |
| Pr-Protein  | Pathogenesis-related proteins                              |
| R           | Resistant                                                  |
| ROS         | Reactive Oxygen Species                                    |
| rt-PCR      | Reverse transcription Polymerase chain reaction            |
| SA          | Salsilic acid                                              |
| SAR         | systemic acquired resistance                               |
| SDS-PAGE    | Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| SOD         | Superoxide dismutase                                       |
| Xt          | Xanthomonas translucens                                    |
| YPGA        | Yeast extract, Peptone, Glucose and Agar                   |

## الفصل الأول

### المقدمة

### Introduction

## 1- المقدمة Introduction:

ينتمي القمح wheat وأصنافه المختلفة إلى الجنس *Triticum* والفصيلة *Tritiaceae* ويعد في طليعة المحاصيل الاستراتيجية العالمية بحكم أهميته الغذائية التي تشكل مصدراً غذائياً لأكثر من 35% من سكان العالم، وبإنتاج مقدّر بـ 774.55 مليون طن في عامي 2020/2021.

ويحتل المرتبة الأولى من حيث الأهمية في الجمهورية العربية السورية لأنه يؤمن الأمان الغذائي المحلي، حيث يشكل 20% تقريباً من مجمل الأراضي المزروعة. وتختلف إنتاجية محصول القمح في سورية من سنة إلى أخرى تبعاً للظروف المناخية وعمليات الخدمة والأساليب المستخدمة في الزراعة، ويمكننا الاطلاع على تطور زراعة هذا المحصول من حيث المساحة والإنتاج من خلال الجدول رقم ( 1,2 ) ( المجموعة الإحصائية، 2020).

مساحة وإنتاج و غلة القمح الطري حسب المحافظات لعام ٢٠٢٠ وتطورها على مستوى القطر خلال الفترة (٢٠١١-٢٠٢٠)

Area, Production & Yield of Soft Wheat by Governorate for 2020  
& their Development at the Country Level during (2011-2020)

| الجدول ( 1 ) | المساحة : هكتار | الإنتاج : طن        | الغلة : كغ/هـ | Yield : Kg/Ha | Production : M.T.   | Area : Ha     | Table (11) |
|--------------|-----------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------|
| Item         | المجموع Total   |                     |               | Non-Irrigated |                     |               | البيان     |
|              | غلة<br>Yield    | إنتاج<br>Production | مساحة<br>Area | غلة<br>Yield  | إنتاج<br>Production | مساحة<br>Area |            |
| 2011         | 2260            | 1814518             | 802925        | 634           | 276772              | 436776        | 2011       |
| 2012         | 2079            | 1775722             | 854056        | 544           | 242856              | 446270        | 2012       |
| 2013         | 2298            | 1570967             | 683487        | 1545          | 534105              | 345599        | 2013       |
| 2014         | 1508            | 1071369             | 710251        | 561           | 220529              | 392960        | 2014       |
| 2015         | 2522            | 1401285             | 555670        | 1454          | 387570              | 266463        | 2015       |
| 2016         | 1380            | 584733              | 423700        | 856           | 239034              | 279163        | 2016       |
| 2017         | 1403            | 696159              | 496214        | 1017          | 340165              | 334640        | 2017       |
| 2018         | 969             | 468304              | 483218        | 197           | 61179               | 310388        | 2018       |
| 2019         | 2116            | 1321296             | 624442        | 1506          | 588205              | 390698        | 2019       |
| 2020         | 1939            | 1175622             | 606415        | 1341          | 531076              | 396168        | 2020       |
| Sweida       | -               | -                   | -             | -             | -                   | -             | السويداء   |
| Dar'a        | -               | -                   | -             | -             | -                   | -             | درعا       |
| Quneitra     | -               | -                   | -             | -             | -                   | -             | القيسية    |
| Damascus     | -               | -                   | -             | -             | -                   | -             | ريف دمشق   |
| Homs         | 2640            | 3178                | 1204          | 1414          | 322                 | 228           | حمص        |
| Hama         | 1844            | 1106                | 600           | -             | -                   | -             | حمص        |
| Ghab         | 3752            | 10085               | 2688          | 2950          | 522                 | 177           | الغاب      |
| Idleb        | 995             | 27774               | 27925         | 796           | 17585               | 22100         | الدرعية    |
| Tartous      | 3351            | 7456                | 2225          | 1853          | 159                 | 86            | طرطوس      |
| Lattakia     | 1800            | 27                  | 15            | 1800          | 27                  | 15            | اللاذقية   |
| Aleppo       | 1890            | 228331              | 120840        | 1269          | 100193              | 78980         | حلب        |
| Al-Raqqa     | 2357            | 320500              | 136000        | 1612          | 122500              | 76000         | الرقة      |
| Dair-Ezzor   | 3100            | 65100               | 21000         | -             | -                   | -             | دير الزور  |
| Al-Hassake   | 1742            | 512065              | 293918        | 1326          | 289768              | 218582        | الحسكة     |

مساحة وإنتاج و غلة القمح القاسي حسب المحافظات لعام ٢٠٢٠ وتطورها على مستوى القطر خلال الفترة (٢٠٢٠-٢٠١١)

Area, Production &amp; Yield of Durum Wheat by Governorate for 2020

&amp; their Development at the Country Level during ( 2011-2020)

| الجدول ( 2 ) | المساحة : هكتار | الإنتاج : طن        | العلة : كغ/هـ | Yield : Kg/Ha | Production : M.T.   | Area : Ha     | Table (12) |
|--------------|-----------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------|
| Item         | المجموع Total   |                     |               | Non-Irrigated |                     |               | البيان     |
|              | علة<br>Yield    | إنتاج<br>Production | مساحة<br>Area | علة<br>Yield  | إنتاج<br>Production | مساحة<br>Area |            |
| 2011         | 2846            | 2043813             | 718113        | 1045          | 334960              | 320668        | 2011       |
| 2012         | 2449            | 1833374             | 748758        | 921           | 311155              | 337761        | 2012       |
| 2013         | 2333            | 1611144             | 690591        | 1396          | 461218              | 330405        | 2013       |
| 2014         | 1650            | 952964              | 577634        | 768           | 221915              | 288925        | 2014       |
| 2015         | 2276            | 1460343             | 641530        | 1321          | 463821              | 351228        | 2015       |
| 2016         | 1512            | 1141514             | 754806        | 671           | 273227              | 407296        | 2016       |
| 2017         | 1714            | 1154581             | 673697        | 1036          | 390405              | 376775        | 2017       |
| 2018         | 1230            | 754684              | 613600        | 388           | 143545              | 370415        | 2018       |
| 2019         | 2446            | 1763802             | 721165        | 1716          | 623883              | 363645        | 2019       |
| 2020         | 2248            | 1672849             | 744123        | 1309          | 490571              | 374689        | 2020       |
| Sweida       | 962             | 30522               | 31730         | 916           | 28643               | 31286         | السويداء   |
| Dar'a        | 1157            | 90109               | 77860         | 957           | 65549               | 68500         | درعا       |
| Quneitra     | 453             | 3306                | 7302          | 402           | 2406                | 5991          | القيصرية   |
| Damascus     | 3148            | 52541               | 16688         | 1221          | 2219                | 1817          | ريف دمشق   |
| Homs         | 1836            | 64874               | 35332         | 1503          | 42158               | 28058         | حماص       |
| Hama         | 3549            | 129727              | 36554         | 2402          | 31855               | 13260         | حمص        |
| Ghab         | 3571            | 138387              | 38753         | 2571          | 3663                | 1425          | الغاب      |
| Idleb        | 1333            | 22764               | 17075         | 802           | 6335                | 7900          | الليسان    |
| Tartous      | 1543            | 15221               | 9865          | 1148          | 9235                | 8044          | طرطوس      |
| Lattakia     | 1727            | 3799                | 2200          | 1727          | 3799                | 2200          | اللاذقية   |
| Aleppo       | 2348            | 362071              | 154182        | 1598          | 133922              | 83790         | حلب        |
| Al-Raqqa     | 3100            | 310000              | 100000        | -             | -                   | -             | الرقة      |
| Dair-Ezzor   | 3200            | 156800              | 49000         | -             | -                   | -             | دير الزور  |
| Al-Hassake   | 1747            | 292729              | 167582        | 1313          | 160788              | 122418        | الحسكة     |

يعتبر النظام الزراعي للقمح ضعيف بسبب تدهور مجموعة من العوامل الهامة في إنتاجيته مثل نوعية التربة، التصحر، التغيرات المناخية التي أدت إلى التحكم بظهور ضغوط إمراضية جديدة، أدى الجفاف الناتج عن التغيرات المناخية أيضاً إلى تغيرات في مجتمعات الأمراض التي تصيب هذه الزراعة. أدى نقص المياه في بعض الدول والتحول نحو الري الرذاذي إلى ظهور أمراض جديدة أكثر تخصصية، منها الأمراض البكتيرية التي تحد بشكل كبير من الإنتاج في كل مناطق زراعة القمح وبشكل خاص في المناطق المروية، فمثلاً يساعد الري في تطور الأمراض البكتيرية (Maraite *et al.*, 2007).

يصاب القمح بالعديد من الآفات والأمراض، بشكل متزامن أو مستقل، ويمكن أن تصل الأضرار الناتجة عن الحشرات والفقد الناتج عن الأمراض إلى 20 % من الإنتاج، وحتى التدمير الكامل للمحصول ( Duveiller, 2007; Mehta, 1990; Maraite *et al.*, 1989). فقد قدرت الخسائر التي سببها مرض الصدأ المخطط

*Puccinia glumarum* على القمح في سورية عام 2010 حوالي مليون طن، بما يعادل حوالي عشرين مليار ليرة سورية في حينها.

يختلف عدد وأهمية الأمراض التي تصيب القمح حسب المنطقة الجغرافية والظروف المناخية السائدة وكذلك حسب الأصناف المزروعة وطبيعة النظام الزراعي. حيث أن الأمراض الأكثر أهمية ذات أصل فيروسي، فطري وبكتيري ومنها: فيروس الموزاييك المخطط للقمح Wheat streak mosaic virus، الأصدنة (صدأ الساق الأسود *Puccinia graminis*)، صدأ الأوراق البني *Puccinia recondita*، والصدأ المخطط (الأصفر *Puccinia glumarum*)؛ والتفحمت (التفحم المغطى *Tilletia* spp.، والتفحم السائب *Ustilago nuda*)؛ لفحة السنابل *Fusarium* spp.؛ التبقع السبثوري *Septoria* spp.؛ التخطيط الهيلمثوسبوري *Helminthosporium gramineum* وأعفان جذور القمح الشائعة كأمراض فطرية (Zillinsky, 1983).

وعفن العصافة القاعدية *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* ولفحة الأوراق البكتيرية *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ومرض التخطيط الشفاف البكتيري (العصافة السوداء *Xanthomonas translucens* وغيرها من الأمراض البكتيرية (Maraite et al., 2007).

يتوجب على العاملين بالقطاع الزراعي في العالم زيادة إنتاج القمح بنسبة 50% بحلول عام 2050 لتلبية الزيادة السكانية المتوقعة، تعد هذه الزيادة المطلوبة في الإنتاجية تحدياً كبيراً للباحثين، حيث يجب عليهم مواجهة الإجهادات اللاحيوية كنقص المياه وارتفاع درجات الحرارة، والأهم مواجهة الإجهادات الحيوية أي الأمراض والآفات المختلفة التي تصيب القمح (Kayim et al., 2022).

ينقسم هذا البحث إلى ثلاثة أقسام رئيسية، القسم الأول هو دراسة مرجعية للأبحاث المنشورة على أمراض أعفان جذور القمح وتخطط الورقة البكتيري والأبحاث المنشورة على آليات تحريض المقاومة ومحفزات المقاومة وبشكل رئيسي بروتين الهاربين، أما القسم الثاني فهو مواد وطرائق العمل حيث ذكر فيه طرائق الحصول على بروتين

الهاربين ودراسة خصائصه وطرائق تقييم كفاءته في تحريض الأنزيمات الدفاعية البيروكسيداز والسوبركسيد دسموتاز والفلافونيدات، وطرائق تقييم فعاليته لمقاومة ممرضات أعفان الجذور وتخطط الورقة البكتيري، أما القسم الثالث فذكرت فيه نتائج التجارب السابقة ومناقشتها وتفسيرها، إضافة لذكر أهم الاستنتاجات والتوصيات.

### 1-1: الإشكالية البحثية Research Problem:

يعد القمح من أهم المحاصيل المنتشرة على نطاق واسع في أنحاء العالم، حيث يمثل الأمان الغذائي للعديد من الدول ولكونه يتمتع بقيمة غذائية لاحتوائه على كثير من العناصر الغذائية الهامة. وجدت زراعة القمح في سورية منذ القدم، وزادت أهميتها والاعتناء بها في العقود الأخيرة، لكنها تعاني من مشاكل عديدة أهمها الآفات العديدة التي تصيب القمح سواء حشرية أو مرضية، عدا عن معاناة سورية في السنوات الأخيرة كغيرها من دول العالم من ظروف الجفاف ونقص الموارد المائية، مما يزيد من حجم العقبات أمام زراعة هذا المحصول، واستخدمت المبيدات لكن تكاليفها العالية وخطورتها على البيئة والمجتمع، عدا عن محدوديتها لبعض الأمراض أدت إلى انخفاض استخدامها، وظهور مقاومة من قبل العديد من السلالات الممرضة تجاه هذه المبيدات، فاتجهت الأبحاث إلى عدد من التقانات لحل مشاكل الآفات؛ كاستنباط أصناف مقاومة أو متحملة للإصابة، أو استخدام التقانات الحيوية إلا أن ذلك حقق نجاحاً محدوداً؛ بسبب التعقيد الفيزيولوجي والوراثي لصفات المقاومة عند النباتات، عدا قدرة الممرضات بشكل خاص على كسر صفة المقاومة عند النبات. في هذا السياق، أصبح استعمال بعض المركبات المحفزة لزيادة تحمل النبات للإجهاد ورفع مقاومته، كبروتين الهاربين، رائجاً في الوقت الحالي لكونه آمناً حسب جميع الدراسات.

### 1-2 : تساؤلات البحث Research Question:

هي أسئلة توجه عملية جمع وتحليل البيانات، وتساعد في تحديد نطاق واتجاه الدراسة.

وفي هذا البحث، يمكن صياغة التساؤلات التالية:

- أ- كيف يمكن الحصول على بروتين الهاربين النقي من البكتيريا؟
- ب- كيف يمكن اختبار كفاءة بروتين الهاربين في تحريضه لردود الفعل الدفاعية في نبات القمح؟
- ت- ماهي أهم الأنزيمات الدفاعية التي تعبر عن حالة النبات ومقاومته للأمراض وماهي طرق قياسها؟
- ث- كيف يؤثر استخدام بروتين الهاربين على نمو وإنبات القمح؟
- ج- ما هي أهم أنواع مسببات عفن الجذور الشائع التي تصيب زراعات القمح في سورية؟
- ح- هل بروتين الهاربين المنتج محلياً ذو كفاءة في تحفيز مقاومة القمح ضد بكتيريا التخطيط الشفاف وأعفان الجذور الشائعة؟

### 3-1 : فرضيات البحث Research Assumes:

وفي هذا البحث، يمكن صياغة الفرضيات التالية:

- أ. إصابة القمح بالعديد من الآفات تؤدي لانخفاض وتدهور الانتاج.
- ب. يمتلك الهاربين فعالية في تحفيز الآليات الدفاعية في نبات القمح من خلال تحريضه لانتاج الأنزيمات الدفاعية مثل أنزيم Peroxidase وأنزيم Superoxide dismutase .
- ج. رش القمح ببروتين الهاربين يحسن من نمو وإنبات القمح، ويحرض مقاومته لفطريات أعفان الجذور الشائعة ولبكتيريا تخطط الورقة الشفاف.

### 4-1 : مسلمات البحث Research Postulates:

في هذا البحث، يمكن ذكر المسلمات التالية:

- أ- يعد القمح من أهم المحاصيل الغذائية في سورية، ويؤمن الأمن الغذائي للسكان.

ب- بروتين الهاربين من أشهر الجزيئات البروتينية التي تؤدي لتحريض المقاومة الجهازية المكتسبة.

ت- مسببات عفن الجذور الشائع والتخطط الشفاف البكتيري هي من أخطر الأمراض التي تصيب زراعات القمح، وتؤدي لخسائر كبيرة في المحصول.

ث- المبيدات والأسمدة الكيميائية التي تستخدم لمكافحة أمراض القمح إما قاصرة أو أنها ضارة تحوي مواد سامة وخطيرة تضر بالصحة العامة والبيئة.

ج- بروتين الهاربين هو بروتين بكتيري الأصل، يفرز عن طريق نظام الإفراز الثالث.

ح- للهاربين أهمية في تحريض مقاومة النباتات تجاه مجال واسع من الآفات سواء الحشرية أو الفطرية أو البكتيرية أو الفيروسية، وكذلك تعزيز نمو النباتات.

#### 5-1 : أهداف البحث Research Objectives:

1. عزل وتنسل مورثة Hrp N من بكتيريا *Erwinia amylovora* وتعبيرها في *E.coli* وتنقية بروتين الهاربين وتحديد خصائصه.
2. تقييم كفاءة البروتين المنتج في تحريض بعض الردود الدفاعية على القمح (قياس فعالية بعض الأنزيمات السوبركسيد دسموتاز SOD والبيروكسيداز (POD).
3. دراسة التعبير المورثي لمورثتي الـ SOD والـ POD.
4. تقييم كفاءة البروتين المنتج في تحريض مقاومة القمح تجاه أعفان جذور الشائعة على القمح.
5. تقييم كفاءة البروتين المنتج في تحريض مقاومة القمح تجاه التخطط الشفاف على القمح.

#### 6-1: أهمية موضوع البحث Importance of Research:

- أ- تبرز أهمية هذا البحث من خلال مساهمة بروتين الهاربين في تحريض مقاومة القمح كمحصول رئيسي وهام اقتصادياً وتحفيزه للآليات الدفاعية وإثراء المعرفة من خلال طرق قياس الأنزيمات الدفاعية، وبالتالي توفير بدائل طبيعية ومستدامة للمدخلات الزراعية الكيميائية.
- ب- كما يسهم هذا البحث في حل مشكلة علمية وتطبيقية تواجه زراعة القمح، وهي التخطيط الشفاف البكتيري وأعفان الجذور الشائعة، وتقديم بدائل طبيعية وفعالة في مكافحتها.
- ت- بالإضافة لذلك يسهم هذا البحث في تعزيز نمو وإنتاجية نباتات القمح، وتقليل استخدام المبيدات والمواد الكيميائية التي تضر بالبيئة والانسان وتشكل عبئاً مادياً.

### 7-1: محدوديات البحث Research Limitations:

- أ. الحدود المكانية: زرع القمح في البيت الزجاجي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية- وزارة التعليم العالي، ونُفذ البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية- كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية- دمشق- وزارة التعليم العالي.
- ب. الحدود الزمانية: أجريت اختبارات للتأكد من خصائص وصفات بروتين الهاربين في العام 2019، زراعة القمح ومعاملة البادرات بالبروتين في عام 2020، بينما درست الفعالية الأنزيمية للأنزيمين POD و SOD في العام 2021 حتى منتصف 2022، ودرست فعالية البروتين على الممرضات بالإضافة لدراسة التعبير المورثي لمورثتي *POD* و *SOD* في العامين 2022- 2023.
- ج. الحدود الزراعية: استُعملت 3 أصناف من القمح وهي :

- الصنف شام 3
- الصنف بحوث 5
- الصنف شام 6

د. الحدود الموضوعية: دُرست فائدة معاملة الرش الورقي ببروتين الهاربين المؤشب على بادرات القمح لرفع مقاومتها وتحملها بدون وجود الممرض، ومن ثم لزيادة قوة نموها وزيادة تحملها ومقاومتها للأمراض.

### 8-1: مبررات البحث Research Justifications:

يمكن ذكر مبررات البحث كالتالي:

أ- قلة الدراسات المرجعية في تطبيق الهاربين على محصول القمح، ولعدم وجود دراسات محلية كان من الضروري تقييم دوره في تحريض مقاومة القمح تجاه ممرضاته ومنها أمراض أعفان الجذور وممرض التخطيط الشفاف والتي تعد من الأمراض الشائعة على القمح في سورية .

ب- تعتمد الإستراتيجية المتبعة لمكافحة الأمراض الفطرية عالمياً على استخدام الأصناف التي تحمل أكثر من مورثة مقاومة (Simmonds and Rajaram, 1988)، لكن قد تنهار مقاومة تلك الأصناف بسبب نشوء سلالات جديدة من الفطر الممرض قادرة على كسر صفة المقاومة خلال سنوات قليلة من اعتمادها (Bayles *et al.*, 2000).

ت- ونظراً لقلة المبيدات الفعالة في مكافحة في الحقل ، ولأهمية الـ Harpin في تحريض المقاومة تجاه الآفات وتعزيزه لنمو النباتات وبذات الوقت أمانه على البيئة؛ لذلك عزل وتنسيل وتعبير المورثة المرمزة له هو هدف علمي واقتصادي عالي القيمة لأهميته في مقاومة النباتات ذات الانتاجية العالية تجاه الآفات المختلفة ودوره في الحد من استخدام المبيدات الضارة.

### 9-1: مصطلحات البحث :

يمكن ذكر المصطلحات التالية:

أ- بروتين الهاربين: بروتين بكتيري تفرزه عدة أنواع من البكتيريا ويعد واحداً من أشهر المحفزات البروتينية التي تحرض مقاومة جهازية مكتسبة عند النبات.

ب- تنسيل المورثات: هي عملية نقل مورثة من كائن إلى كائن آخر، تكون هذه المورثة مسؤولة عن إنتاج بروتين معين، والهدف من ذلك إنتاج هذه البروتين بكميات أكبر مخبرياً.

ت- المقاومة الجهازية المكتسبة: هي مقاومة مكتسبة نشطة تحدث بعد عدوى أولية بمسبب مرضي وهي مرتبطة بحدوث فرط الحساسية وتُفيد بمقاومة النبات ضد العامل المُمرض وضد مجموعة كبيرة من المُمرضات.

ث- فطريات تعفن الجذور الشائع: هي من أنواع الفطور التي تسبب عفن الجذور الشائع على القمح وتعتبر أحد أهم الأمراض التي تصيبه.

ج- التخطيط الشفاف البكتيري: يعد أحد أهم الأمراض البكتيرية التي تصيب القمح وتؤدي إلى خسائر كبيرة في المحصول.

## الفصل الثاني

### الدراسة المرجعية

### Literature Review

## 2- الدراسة المرجعية:

**2-1 أعفان جذور القمح الشائعة:** أحد أكثر الأمراض الفطرية التي تصيب القمح في العالم شيوعاً (Ledingham *et al.*, 1973) وهو من الأمراض المسجلة في سورية (النائب وآخرون، 2002)، أهم أعراضه الشكل (1)، تلون السلامية تحت التاجية (Subcrown internode) باللون البني الداكن والذي يعد من أهم الأعراض المميزة للإصابة، يكون التلون بدايةً على شكل بقع صغيرة تنتشر على السلامية ثم تتحد لتغطي مساحة معينة من السلامية، وتبعاً لشدة الإصابة يمكن أن تصل لكامل مساحة السلامية، ويمكن أن يمتد التلون إلى أغصان الأوراق السفلية مؤدياً لتمزقها (Tinline, 1994; Alsadi, 2021)، كما تظهر أعراض لفحة البادرات وموت الاشطاءات، وقبيل النضج تظهر أعراض ابيضاض السنابل (الدخيل، 2020).



الشكل (1) أهم أعراض أعفان جذور القمح الشائعة a: التلون البني للسلامة تحت التاجية ع اليمين النبات سليم ( Moore *et al.*, 2005) b: ابيضاض السنابل في الحقل قبيل النضج (<https://extension.sdstate.edu/>, 2022)

يسبب أعفان جذور القمح الشائعة عدة ممرضات فطرية ذكر أهمها في سورية النائب وآخرون (2002) وهي:

*Pythium* والذي يتبع فصيلة Pythiaceae ورتبة Peronosporales ويسبب مرض تعفن البذور أو ذبول طري للبادرات، وينتشر عندما تكون البادرات متزاحمة والرطوبة الأرضية مرتفعة.

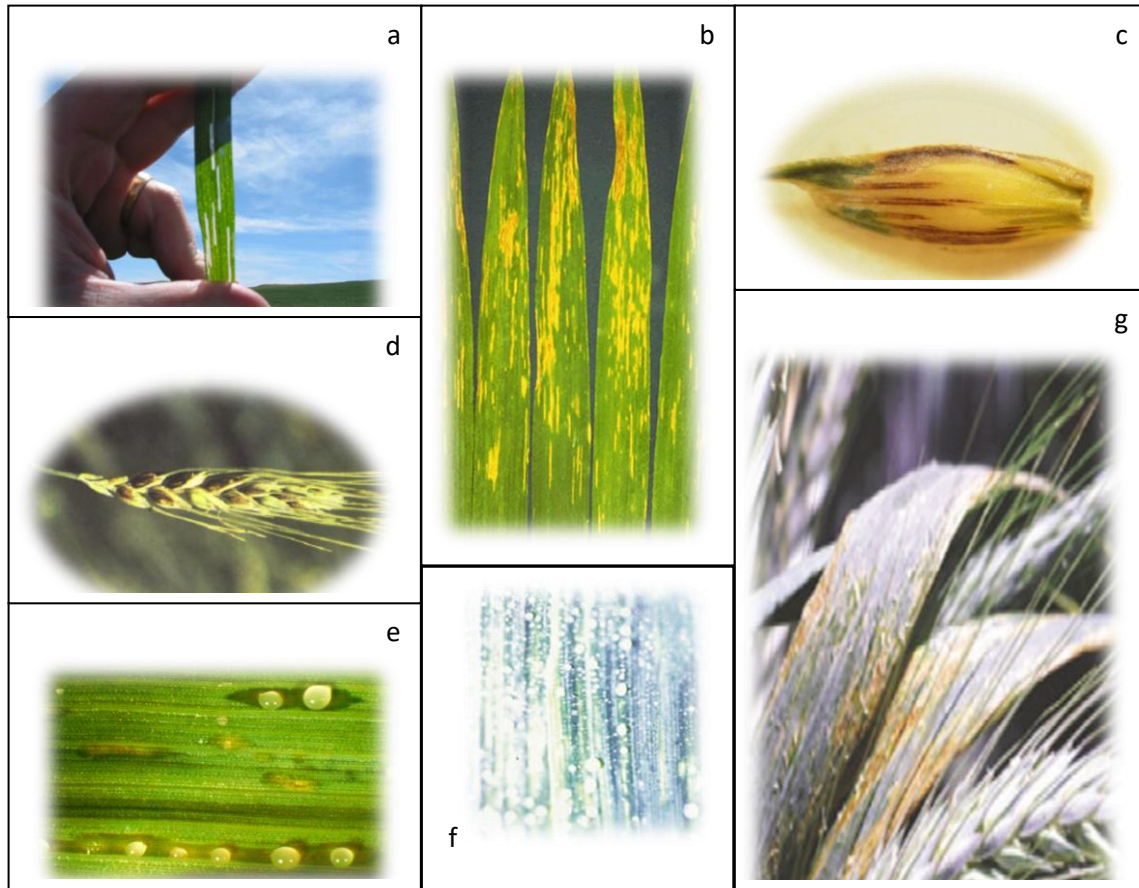
*Rhizoctonia* والذي يتبع فصيلة Thelephoraceae ورتبة Mycelia sterilia متعدد العوائل يسبب عفناً للبذور وذبول البادرات وهو يصيب المنطقة التاجية مسبباً تضيقاً واختناقاً فيها كما يسبب تفرح الساق.

*Fusarium* من الفطريات الناقصة يتبع فصيلة Tuberculariaceae ورتبة Hyphales أبواغه الكونيدية الكبيرة تكون شفافة منجلية الشكل وتقسم ب 3-6 حواجز إلى عدد من الخلايا.

**2-2 مرض التخطط الشفاف البكتيري على القمح:** أظهرت أبحاث عديدة أنّ مرض التخطط الشفاف البكتيري يعد المرض البكتيري الرئيس على القمح في العديد من البلدان (Silva et al., 2009) وهو المرض البكتيري الأكثر انتشاراً في أغلب مناطق زراعة القمح في سورية، حيث وجد أنّ النسبة الوسطية لعزلات هذا المرض كانت (83.3%) من مجموع العزلات المعزولة من القمح على مستوى سورية (مندو، 2007)، وأظهرت الدراسات الأخيرة في سورية وجود 6 طرز وراثية مختلفة لعزلات البكتيريا المدروسة (الصالح، 2017)، سُجل المرض لأول مرة في سورية على شكل انتشار وبائي على صنف القمح القاسي المحلي جزيرة 17 (أسعد، 1987)، حيث أخرج هذا الصنف من الخطة الزراعية برغم صفاته الإنتاجية العالية. تسبب الإصابة فقداً في الغلة قد يصل إلى ما يزيد عن 40 % (Mehta, 1990؛ Maraite et al., 2007)، يعود هذا الفقد لتأثيره على نوعية الحبوب حيث ينخفض وزن الألف حبة بما يعادل 10-30 %، ينتج المرض عن بكتيريا *Xanthomonas translucens*. وهي هوائية، سالبة الغرام، عصوية الشكل، تعطي مستعمرات دائرية لماعة مخاطية وصفراء على وسط الزرع (Sands et al., 1986) وتظهر فرط حساسية على التبغ (Akhtar and Bhutta, 2002)، سالبة أوكسيداز، موجبة كاتلاز (Adhikari et al., 2012). كما تمتاز هذه البكتيريا بأنها تمتلك القدرة على تشكيل نوى تشجع تجمد الماء (ice nucleation activity) عند درجات حرارة 0-10 س (Kim et al., 1987).

**أعراض الإصابة بمرض التخطط الشفاف البكتيري:** تظهر أعراض المرض الشكل (2) على الأوراق على شكل تخططات طولية صغيرة شفافة تميز بسهولة تحت الضوء، وتكون البقع في بداية الإصابة مشبعة بالماء وربما تكون محاطة بهالة خضراء مائية water soaking، ثم تصبح صفراء إلى بنية فاتحة ثم يصبح لونها بنياً غامقاً إلى أسود، تندمج هذه التخططات مع بعضها البعض مشكلة بقعاً طولية بطول عدة سنتيمترات وتغطي مساحات أكبر من سطح الورقة. تشاهد الإفرازات البكتيرية تحت ظروف الرطوبة العالية (Duveiller and Maraite, 2007).

(1993)، تتصلب هذه الإفرازات وتتحول إلى حبيبات راتنجية مصفرة تغطي سطح الإصابة وتتميز بسهولة انفصالها وتصبح بلون أسود في مراحل متقدمة، تتحل هذه القطيرات بوجود الرطوبة (الندى أو في الجو الماطر) مما يعطي قطرات حليبية واضحة تنتشر فيما بعد فوق سطح الورقة ثم تجف وتتساقط كقشرة رقيقة رمادية وغالباً شفافة على شكل حراشف، ويتقدم الإصابة تجف الأوراق وتموت (Maraité *et al.*, 2007)، كما تمتاز هذه البكتيريا بقدرتها على إصابة مختلف أجزاء النبات (السوق والأوراق والأعناق والعصافات والسفاة والحبوب)، وتختلف الأعراض على الأنسجة المصابة حسب البيئة السائدة والصنف المزروع وشراسة الممرض (Duveiller *et al.*, 1997).



الشكل (2) أعراض الإصابة المختلفة ببكتيريا التخطط الشفاف على القمح (Duveiller *et al.*, 1997) a: التخططات الطولية الشفافة ببداية الإصابة b: بقع طولية ناتجة عن اندماج التخططات الصفراء والبنية c: التلون على العصافات d: الأعراض على السنابل e: الإفرازات البكتيرية الصفراء f: قطيرات مخاطية مصفرة مغطيه سطح الإصابة وتتميز بسهولة انفصالها g: القطرات بعد انحلالها وجفافها على شكل قشرة أو حراشف تغطي سطح الورقة.

تعتمد مكافحة الأمراض التي تصيب القمح على الأساليب التقليدية من اتباع الدورة زراعية وزراعة أصناف مقاومة، إضافةً إلى زراعة بذار خالي من الإصابة (Duveiller *et al.*, 1997)، لكن قد تنهار مقاومة تلك الأصناف بسبب نشوء سلالات جديدة من الممرض قادرة على كسر صفة المقاومة خلال سنوات قليلة من اعتمادها (Bayles *et al.*, 2000).

ويمكن اتباع المكافحة الكيميائية المستخدمة لعدد قليل من الأمراض، فبالنسبة للأمراض البكتيرية تنحصر على شكل تطهير الحبوب بالفورمالين أو مواد أخرى (Sands *et al.*, 1981)، وهي مادة ذات خطورة متفاوتة على صحة الإنسان، أما الأمراض الفطرية فاستخدام المبيدات أوسع على نبات القمح لكن إلى جانب تسببها للتلوث البيئي وخطورتها المتفاوتة على الصحة البشرية، فإنها أيضاً تؤدي لظهور عزلات مقاومة من الممرض مما قيد من استخدامها وظهرت محفزات المقاومة عند النبات كبدايل للمبيدات (Pittner *et al.*, 2019)، حيث اتجهت العديد من الأبحاث لإيجاد بدائل غير ضارة بالصحة العامة ومن أهمها محفزات المقاومة التي تحفز الاستجابات الدفاعية مؤدية إلى المقاومة الجهازية المكتسبة SAR التي تعطي النبات مقاومة لمجموعة واسعة من مسببات الأمراض (McDowell and Woffenden, 2003).

بُذِل الكثير من الجهد لفهم آليات المقاومة في النباتات، ويمكن التمييز بين ثلاثة أنواع من المقاومة عند النباتات: المقاومة الجزئية (الأفقية)، المقاومة المتخصصة (العمودية)، المقاومة الجهازية التي تظهر بعد تعرّض النبات لتحريض بعامل ما، حيث تنشط الاستجابات الدفاعية المحرّضة التي تبدأ بالموت الخلوي المبرمج للخلايا المصابة (فرط الحساسية HR Hypersensitive Response)، وتصل إلى تعزيز الأنسجة وإنتاج مركبات دفاعية في مكان العدوى.

ويمكن لهذه الاستجابات الدفاعية بدورها، أن تؤدي إلى استجابة جهازية طويلة الأمد (المقاومة الجهازية المكتسبة SAR) التي تؤدي لمقاومة النبات لمجموعة واسعة من مسببات الأمراض (McDowell and Woffenden, 2003).

**2-3 ردة فعل فرط الحساسية Hypersensitive Response:** عُرف مصطلح فرط الحساسية منذ أكثر من 100 عام عندما لاحظ Ward (1902) استجابات مختلفة عند أصناف القمح للإصابة بمرض صدأ أوراق القمح *Puccinia triticina* وسميت هذه الظاهرة فيما بعد من قبل Stakman (1915) بفرط الحساسية. لاحظ Klement وآخرون (1964) قدرة البكتيريا على إحداث فرط الحساسية، حيث قاموا بحقن سلالة غير شرسة من بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv *syringae* في الفراغات بين الخلايا لأوراق نبات التبغ ولاحظوا موت معظم خلايا النبات في موضع الحقن، لم تحدث البكتيريا الرمية *Pseudomonas fluorescens* فرط الحساسية عند الحقن بينما سببت بكتيريا *P. syringae* pv. *tabaci* تطور تبقيات على الأوراق المُعاملة.

فرط الحساسية HR هو أحد أشكال الموت الخلوي المبرمج Programmed Cell Death وهو ذروة الاستجابة الدفاعية في النبات ويحدث في التفاعل غير التوافقي بين العامل الممرض والعائل حيث يُلاحظ ظهور بقع متماوتة في أماكن العدوى لحصر العامل الممرض في مكان دخوله والحد من انتشاره داخل الأنسجة النباتية وأعراضه تظهر بشكل سريع خلال الـ 24 ساعة من حدوث العدوى ولا يمكن رؤيتها بالعين المجردة في العدوى الطبيعية (Iakimova et al., 2005).

يبدأ التعارف بين النبات والعامل الممرض وهو تعارف متخصص R /Avr، يحدث بعدها تغير في تبادل الأيونات وتزول قطبية الغشاء السيتوبلازمي وقد وجد أن أولى التغيرات البيوكيميائية هي تغير تركيز أيونات الكالسيوم  $Ca^{2+}$  حيث يتدفق من خارج الجدار الخلوي عبر الغشاء السيتوبلازمي إلى داخل الخلية ويلعب دور في تحريض المقاومة (Seybold et al., 2014)، يتم التعرف على التغير في تركيز  $Ca^{2+}$  بواسطة بروتينات calcium-binding proteins مثل calcium-dependent protein kinases (CPKs) والتي تحول هذه الإشارات إلى استجابات فيزيولوجية وخلوية مخصصة فوجد أن OsCPK4 له تأثير إيجابي في تنظيم المناعة عند نبات الرز، حيث أن التعبير المورثي لـ *OsCPK4* يؤمن مقاومة عند نبات الرز ضد فطر *Magnaporthe oryzae* (Bundo and Coca, 2016). وتخرج شوارد  $K^{+}$  وتزول قطبية الغشاء السيتوبلازمي. ثم يتم إنتاج أشكال الأوكسجين الفعالة (ROS) Reactive Oxygen Species بما يعرف بالانفجار التأكسدي oxidative

burst وهو السمة المميزة للتعرف الناجح بين المسبب المرضي والعائل (Kadota *et al.*, 2015). تم الكشف عن إنتاج الأشكال الفعالة من الأوكسجين ( $O_2^-$ ) لأول مرة في أنسجة نبات البطاطا في التفاعل غير التوافقي عند الإصابة بالفطر *Phytophthora infestans* وأثبت دوره في فرط الحساسية (Doke, 1983). تعتبر ROS سامة بما فيه الكفاية لقتل مسببات المرضية وتلعب دوراً هاماً كجزيئات إشارة تتوسط الاستجابات الدفاعية عند النباتات (Lehmann *et al.*, 2015)، يصبح الصنف حساساً عند تثبيط تراكم ROS في نبات الأرز المقاوم للفطر *Magnaporthe oryzae* بالرغم من وجود مورثات المقاومة R (Singh *et al.*, 2016). يتم إنتاج ROS بواسطة عدة انزيمات منها NADPH Oxidase الموجود على الغشاء السيتوبلازمي للخلية والذي تحرضه بروتينات الكيناز، ويحول الأوكسجين الجزيئي إلى سوبر أوكسيد  $O_2^-$  والذي يتحول إلى  $H_2O_2$  بواسطة أنزيم Superoxide dismutase، وأنزيم البيروكسيداز NADH Peroxidase، وهو موجود في الجدار الخلوي للخلية النباتية. وجد أن إنتاج ROS في الجسيمات الصانعة الخضراء يتوسط تفعيل الاستجابات الدفاعية ويلعب الدور الأساسي في HR بينما إنتاج ROS في الميتوكوندريا يلعب دوراً في تنشيط الاستجابات الدفاعية ولكنه لا يشارك مباشرة في HR (Jwa and Hwang, 2017).

**2-4 المقاومة المستحثة Induced Resistance:** تمتلك النباتات العديد من الآليات للدفاع عن نفسها ضد مسببات المرضية، بعضها بنيوية Structural تكون موجودة أصلاً في النبات أو تتكون استجابة للإصابة بالكائن الممرض وبعضها كيميائية حيوية Biochemical تكون موجودة بالنبات، أو تُستحث نتيجة الإصابة وتسمى هذه المقاومة بالمقاومة التأسيسية Constitutive Resistance. عند حدوث اتصال بين النبات والعامل الممرض يتم استقبال جزيئات الـ PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) مثل glucans، chitin، flagellin بواسطة مستقبلات الخلية Pattern recognition receptors (PRRs) ويتم تفعيل سلسلة الفسفرة بواسطة أنزيمات الكيناز، مما يؤدي إلى تفعيل سيل من الاشارات ينتهي بتفعيل الردود الدفاعية غير المتخصصة (Jones and Dangl, 2006).

يمكن للنبات أيضاً أن يطور مقاومة جهازية في النبات وهي المقاومة الجهازية المكتسبة systemic acquired resistance (SAR) والمقاومة الجهازية المحرضة induced systemic resistance (ISR) وتختلفان بطبيعة المحرض والإشارات الخلوية المسؤولة عن تفعيل المقاومة (Walters *et al.*, 2013).

**2-5 المقاومة الجهازية المكتسبة SAR:** هي مقاومة مكتسبة نشطة تحدث بعد عدوى أولية بمسبب مرضي وهي مرتبطة بحدوث فرط الحساسية وتُفيد بمقاومة النبات ضد العامل الممرض وضد مجموعة كبيرة من الممرضات وهي نوعين: موضعية Local acquired resistance (LAR) تحدث حول منطقة الإصابة بعد حدوث فرط الحساسية وتتراكم فيها بعد فترة جزيئات حمض الصفصاف Salsilic acid (SA) و Pathogenesis-related proteins (PR-proteins) والفيتوالكسينات phytoalexins، وجهازية systemic acquired resistance (SAR) تظهر في الأنسجة البعيدة عن منطقة الإصابة وتؤمن مقاومة النبات ضد العامل الممرض نفسه أو عوامل ممرضة أخرى وتورث المقاومة الجهازية إلى أفراد الجيل الثاني (Luna *et al.*, 2012). وتعد هذه المقاومة فعالة ضد مجموعة واسعة من العوامل الممرضة والطفيليات بما فيها الفطريات والبكتيريا والفيروسات والنيماطودا والنباتات الطفيلية والحشرات (McDowell and Dangl, 2000; Bektas and Eulgem, 2015)، حيث تستخدم فيها إما سـلالات معينة من العامل الممرض أو محفزات حيوية وكيميائية.

على المستوى الجزيئي تتفعل مورثات البروتينات ذات العلاقة بالإمراضية PR-proteins والتي ترمز مجموعة من البروتينات منخفضة الوزن الجزيئي والتي تحرض أيضاً باستخدام محفزات المقاومة الأخرى، وتم وصف معظم الاستجابات الدفاعية التي تتوسطها الـ PR-protein عند نبات التبغ و نبات العربية *Arabidopsis thaliana* والخيار (Bektas and Eulgem, 2015). وتشير دراسة حديثة إلى أن PR1 يرتبط ويعزل ستيرولات العائل اللازمة لنمو العامل الممرض مما يشير إلى دور هذا البروتين كمضاد للميكروبات (Gamir *et al.*, 2017).

تتميز المقاومة الجهازية المكتسبة بتراكم جزيئات حمض الصفصاف SA ويزداد تركيزها في موقع الإصابة وبشكل أقل في أجزاء النبات الأخرى البعيدة عن منطقة الإصابة (Bektas and Eulgem, 2015)، وأظهرت الدراسات أن SA يلعب دور إشارة جهازية حيث أنه في هذه الدراسات اكتشفت نسبة عالية من SA في اللحاء في مواضع الإصابة والأنسجة البعيدة عن منطقة الإصابة (Tripathi et al., 2019).

**2-6 محفزات المقاومة Resistance Elicitors:** توجهت الأنظار حديثاً إلى استخدام المقاومة الجهازية المكتسبة SAR في برامج إدارة الأمراض النباتية بسبب خواصها الفريدة وفعاليتها في تحريض المقاومة ضد الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية، ولا تترك أثراً ضاراً في البيئة، ولتظهر المقاومة الجهازية عند النباتات تحتاج لمحفزات تحرض واحداً أو أكثر من ردود الفعل الدفاعية بغياب حدوث الإصابة بالعامل الممرض، وتقسم هذه المحفزات إلى محفزات متخصصة يفرزها العامل الممرض وتؤثر في نبات معين، ومحفزات عامة داخلية منشأها النبات، ومحفزات عامة خارجية منشأها العامل الممرض وتختلف بتركيبها الكيميائي فمنها ذات طبيعة ليبيدية ومنها سكرية ومنها بروتينية (Walters et al., 2008)، بالنسبة للمحفزات الكيميائية، أول مركب صناعي استخدم في المقاومة هو من مشتقات حمض Polyacrylic حيث حرّض المقاومة عند نبات التبغ تجاه فيروس موزاييك التبغ (TMV) بتنشيط التعبير المورثي لمورثة *PR1* (Gianinazzi and Kassanis, 1974). كذلك استخدم الـ Probenazole في تحريض المقاومة عند نبات الأرز تجاه بكتيريا لفحة الأوراق *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* حيث ساهمت المعاملة بتخفيض شدة المرض بشكل معنوي مقارنة مع الشاهد (Young and Huang, 1993).

قام Vallad and Goodman (2004) بتسليط الضوء على 32 دراسة استخدم فيها BTH (شبيه بحمض الصفصاف) كمحرض للمقاومة ووجد أنه في 28 منها ساهم هذا المركب بتخفيض شدة الإصابة بنسبة تراوحت بين 4-80% وفي ثلاث منها انخفضت نسبة الإصابة بمعدل فوق 80%. استخدم Hadwiger and Beckman الـ Chitosan لأول مرة عام 1980 وأثبت دوره كمحفز للمقاومة عند نبات البازلاء تجاه فطر *F. solani* f. sp. *Pisi* واستخدم في تحريض المقاومة عند العديد من النباتات مثل التبغ، القمح، فول الصويا

ويشيط الـ Chitosan نمو العديد من الأنواع البكتيرية. استخدم مركب  $\beta$ -amino butyric acid (BABA) رشاً على أوراق الكرمة وتسبب بانخفاض شدة الإصابة بمرض البياض الزغبى الناجم عن *Plasmopara viticola* حيث يمكن استخدام هذا المركب بشكل فعال في برامج مكافحة هذا المرض (Reuveni *et al.*, 2001).

أدت معاملة القطن بكلاً من حمض الصفصاف والكيوتوزان وحمض الخل والسكريات المعقدة الخارجية EPS إلى تحفيز المقاومة لدى القطن عبر تفعيل إحدى ردود الفعل الدفاعية والتي تتمثل بزيادة فعالية كل من أنزيمي السوبركسيد دسموتاز SOD والبيروكسيداز POD أو عبر زيادة التعبير المورثي لمورثة *GhLOXI*. (Keshkeih, 2014)، وطبق (Niri *et al.*, 2023) فلافونيد naringenin وحمض الفوليك لتحريض مقاومة القمح ضد بكتيريا التخطيط الشفاف حيث أدى استخدام هذه المواد لزيادة فعالية أنزيمي POD و SOD ، كما ازدادت فعالية الكاتالاز والفينيل ألانين أمونيالياز والبيروكسيداز عند معاملة القمح بـ حمض الصفصاف لمكافحة الممرض *Mycosphaerella graminicola* (Gholamnezhad *et al.*, 2016)

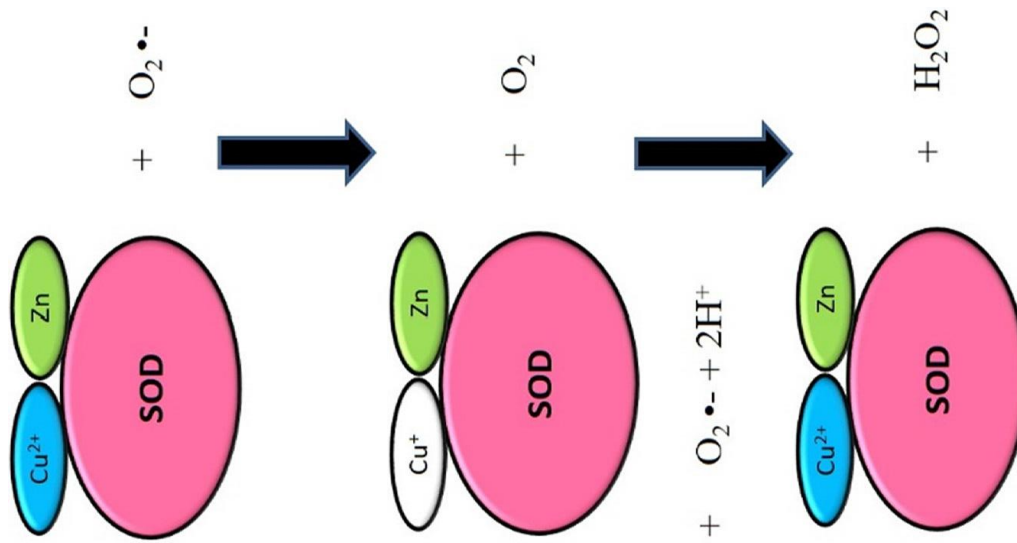
**2-7 الأنزيمات المتعلقة بـردود الفعل الدفاعية:** هناك عدة أنزيمات تزداد فعاليتها عند تحريض ردود الفعل الدفاعية عند النبات، منها السوبركسيد دسموتاز (SOD) Superoxide dismutase، والبيروكسيداز (POD) Peroxidase، والكاتالاز Catalase، والفينيل ألانين أمونيا لياز -phenylalanine ammonia-lyase، وبذلك يمكن أن تستخدم وتدرس فعاليتها كمؤشرات للمقاومة (Gholamnezhad *et al.*, 2016; Niri *et al.*, 2023).

**2-7-1 أنزيم السوبركسيد دسموتاز (SOD) superoxide dismutase :** يعد أنزيم SOD ( EC

1.15.1.1) أحد أهم الأنزيمات التي تدرس كميتها وفعاليتها في النباتات كأحد مؤشرات المقاومة، وهو من البروتينات المعدنية، عُزل لأول مرة عام 1959، حيث وصف بأنه من البروتينات المعدنية الحاوية على النحاس، وفي عام 1969 عرف الفعل الأنزيمي له وسمي بالـ SOD حيث اكتشف دوره في الدفاع ضد الإجهاد التأكسدي في الكائنات هوائية التنفس (الإبراهيمي، 2015)، تختلف النظائر الأنزيمية للـ SOD بحسب الأيونات المعدنية

الداخلية في تشكيل الموقع النشط ( نحاس، زنك، منغنيز وحديد ) (Gill and Tuteja, 2010)، وتعد مورثات Cu/Zn-SODs الأكثر توافراً في جينوم القمح حيث شكلت 17 من أصل 26 مورثة ( Jiang *et al.*, 2019).

يعد السوبر أوكسيد دسموتاز من أهم الانزيمات المسؤولة عن إزالة الجذور الحرة للاوكسجين ROS، حيث يعمل كمضاد لإجهاد الأكسدة في النباتات (Cyprus and Pratico, 2006; Leonowicz *et al.*, 2018)؛ وذلك عن طريق تحويل anion superoxide إلى هيدروجين بيروكسيد (الإبراهيمي، 2015) الشكل (3).



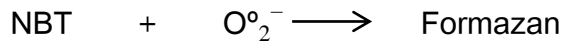
الشكل (3) مخطط تمثيلي لتفاعل انزيم الـ SOD بأنواعه مع الأنيون سوبراوكسيد (Razak *et al.*, 2021)

بيّنت العديد من الدراسات زيادة نشاط الـ SOD في مجموعة واسعة من الأنواع النباتية تحت ظروف الإجهادات الحيوية والإصابة بالأمراض المختلفة (Pittner *et al.*, 2019; Ramzan *et al.*, 2021) والإجهادات اللاحيوية المختلفة (Alikamanoglu and Sen, 2011; Patade *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013).

يعتمد مبدأ الكشف عليه على تفاعل الريبوفلافين مع الميثيونين منتجاً anion superoxide والذي يتفاعل مع

NitroBlueTetrazolium معطياً الفورمازان Formazan الأزرق





يتم قياس الامتصاصية للفورمازان على طول موجة 560 nm، وفي حال وجود أنزيم SOD فإنه يتنافس مع

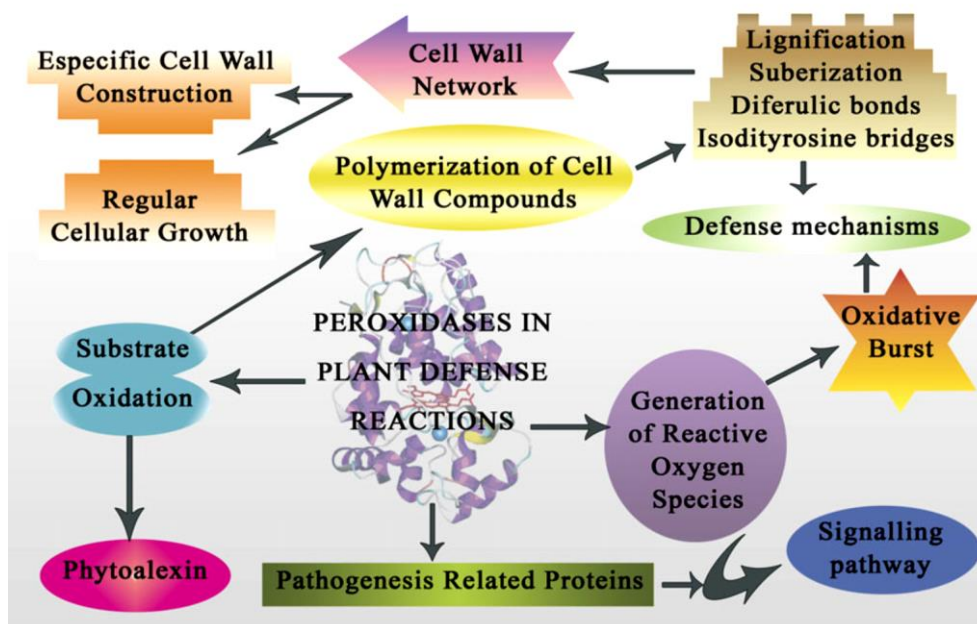
NBT على  $\text{O}_2^{\bullet -}$  المتشكل حسب التفاعل التالي:



وبالتالي عملية تثبيط اختزال NBT هي مقياس لكمية SOD الموجودة وكل واحدة SOD تمثل تثبيط 50% من تشكل الفورمازان الأزرق (Giannopolitis and Ries, 1977).

**2-7-2 أنزيم البيروكسيداز (POD):** يعد البيروكسيداز (EC 1.11.1.7) أحد أهم مؤشرات المقاومة النباتية الشكل (4) وهو من الأنزيمات المعطية والمستقبلية للاكترونات، ويعد وسيطاً لكثير من التفاعلات الفيزيولوجية والكيميائية خلال دورة حياة النبات التي تؤدي لردود فعل دفاعية تجاه الإجهادات الحيوية وغير الحيوية (Almagro *et al.*, 2009)، فيشارك البيروكسيداز POD في النبات بعملية اللغنة (Whetten *et al.*, 1998) والتغلن (Espelie *et al.*, 1986) وتفكيك الأشكال الفعالة للأوكسجين (Lagrimini *et al.*, 1997) والتخلص من بيروكسيد الهيدروجين  $\text{H}_2\text{O}_2$  السام للنبات (Chakraborty and Pradhan, 2012) ومقاومة الشخوخة (Abeles *et al.*, 1988) وتحمل الإجهاد الملحي (Amaya *et al.*, 1999) والتنام الجروح والدفاع ضد العدوى بالمرضات النباتية؛ حيث يتوسط تفاعل أكسدة لبعض المواد الفينولية فتتحول إلى مركبات أخرى منها يدخل باصطناع الفيتوالكسينات ومنها ما يلعب دور في تدعيم الجدر الخلوية (Almagro *et al.*, 2009).

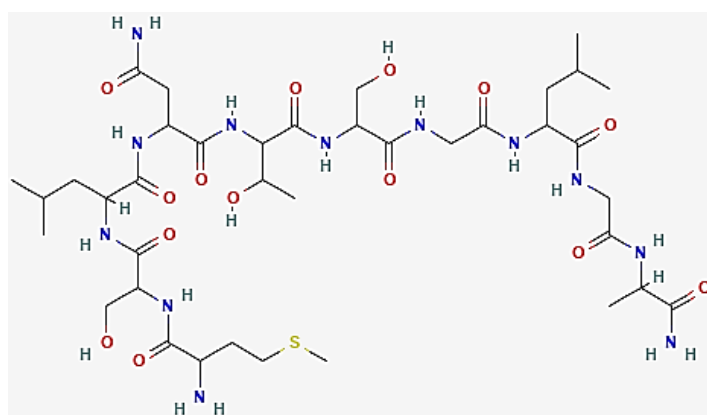
يعتمد مبدأ الكشف على البيروكسيداز على تفاعل غاياكول guaiacol مع بيروكسيد الهيدروجين  $\text{H}_2\text{O}_2$  مع الزمن بوجود أنزيم البيروكسيداز منتجاً مادة tetraguaiacol التي تقاس على طول موجة 470 نانومتر بحيث كلما زاد وجود الأنزيم في النبات يزداد إنتاج مادة تيتراغاياكول (Martinez *et al.*, 2000).



الشكل (4) مخطط تمثيلي يبين دور أنزيم البيروكسيداز في ردود الفعل الدفاعية لدى النبات (Almagro *et al.*, 2009)

**8-2 بروتين الهاربين Harpin:** يعد بروتين الهاربين الشكل (5) من أشهر الجزيئات البروتينية التي تؤدي لتحريض المقاومة الجهازية المكتسبة (McDowell and Woffenden, 2003).

تنتج بروتين الهاربين عدة أنواع من البكتيريا الممرضة للنبات كما في الجدول (3)، أشهرها الهاربين المنتج من البكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة لمرض اللفحة النارية على التفاحيات (Reboutier *et al.*, 2007)؛ حيث تتميز هذه البكتيريا بأنها تحتوي على المورثة Hrp N المرمزة للبروتين هاربين (Perino *et al.*, 1999).



الشكل (5) التركيب الكيميائي لبروتين الهاربين النقي (NCBI, 2023)

الجدول (3) بروتينات الهاربين الموصفة في عدة أنواع بكتيرية ممرضة للنبات (Choi *et al.*, 2013)

| Names <sup>a</sup> | Source bacteria                                    | Protein features |             |            | Bacterial virulence-related features |                       |                       | Functional features in plants |                 |                                          |
|--------------------|----------------------------------------------------|------------------|-------------|------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------------------|
|                    |                                                    | N <sup>b</sup>   | Glycine (%) | Serine (%) | pI <sup>c</sup>                      | Severity <sup>d</sup> | Effector <sup>e</sup> | Lipid <sup>f</sup>            | HR <sup>g</sup> | Defense <sup>h</sup> Growth <sup>i</sup> |
| HrpN group         |                                                    |                  |             |            |                                      |                       |                       |                               |                 |                                          |
| HrpN               | <i>Erwinia amylovora</i>                           | 403              | 22.6        | 10.2       | 4.59                                 | +                     | +                     | +                             | +               | +                                        |
| HrpN               | <i>E. pyrifoliae</i>                               | 428              | 25.9        | 11.0       | 4.64                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpN               | <i>Dickeya dadantii</i> ( <i>E. chrysanthemi</i> ) | 340              | 16.2        | 11.8       | 6.42                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpN               | <i>E. carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>      | 356              | 21.3        | 11.2       | 5.24                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpZ1 group        |                                                    |                  |             |            |                                      |                       |                       |                               |                 |                                          |
| HrpZ1              | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>      | 370              | 15.7        | 11.6       | 4.06                                 | ND                    | +                     | +                             | +               | +                                        |
| HrpZ               | <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>         | 345              | 12.8        | 10.1       | 4.21                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpZ               | <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>             | 341              | 13.2        | 10.0       | 4.16                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpZ               | <i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>             | 345              | 12.8        | 9.9        | 4.21                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpZ               | <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>               | 140              | 8.6         | 10.0       | 4.85                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpW1 group        |                                                    |                  |             |            |                                      |                       |                       |                               |                 |                                          |
| HrpW1              | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>               | 424              | 15.3        | 7.1        | 4.63                                 | -                     | +                     | ND                            | +               | ND                                       |
| HrpW               | <i>E. amylovora</i>                                | 447              | 14.3        | 11.9       | 4.66                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| PopW               | <i>Ralstonia solanacearum</i>                      | 380              | 12.4        | 8.4        | 6.17                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HopAK1             | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>               | 555              | 7.7         | 10.8       | 7.2                                  | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HrpW <sup>k</sup>  | <i>Rhizobium etli</i>                              | 304              | 10.5        | 8.9        | 4.54                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| Hpa1 group         |                                                    |                  |             |            |                                      |                       |                       |                               |                 |                                          |
| Hpa1               | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>        | 139 (1 Cys)      | 24.5        | 11.5       | 4.07                                 | +                     | ND                    | +                             | +               | +                                        |
| Hpa1               | <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>              | 137 (1 Cys)      | 21.2        | 13.9       | 4.06                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| Hpa1               | <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>              | 137              | 22.6        | 11.7       | 3.85                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HpaG               | <i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>           | 133              | 21.1        | 10.5       | 3.85                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| XopA               | <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>        | 117              | 8.5         | 13.7       | 4.1                                  | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| HreX               | <i>X. campestris</i> pv. <i>pelargonii</i>         | 114 (1 Cys)      | 15.8        | 11.4       | 3.54                                 | ...                   | ...                   | ...                           | ...             | ...                                      |
| Others             |                                                    |                  |             |            |                                      |                       |                       |                               |                 |                                          |
| PopA1              | <i>Ralstonia solanacearum</i>                      | 344              | 20.9        | 6.7        | 4.38                                 | ND                    | ND                    | +                             | +               | ND                                       |
| HopP1              | <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>               | 324              | 15.4        | 12.7       | 4.33                                 | ND                    | +                     | ND                            | +               | ND                                       |
| HpaXm              | <i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>          | 187 (4 Cys)      | 8.6         | 8.0        | 9.96                                 | ND                    | ND                    | ND                            | +               | ND                                       |

يُفرز الهاربين عن طريق نظام الإفراز الثالث في البكتيريا سالبة غرام الممرضة للنبات (Choi *et al.*, 2013)،  
يعدّ من البروتينات الغنية بالغلايسين والفقيرة بالسيستين (Vrancken *et al.*, 2013)، يمتاز بثباته الحراري  
(15 دقيقة على درجة حرارة 100 س) يمتاز بـ pH حامضي وحساس للبروتياز، وزنه الجزيئي 44 كيلو دالتون  
عند *Erwinia amylovora* (Wei *et al.*, 1992)، و39 كيلو دالتون عند *Pseudomonas*، منحل بالماء  
(Dong *et al.*, 2004)، يلعب دوراً بالشراسة في النبات العائل، حيث أنّ إجراء طفرة على مورثته أدى إلى  
انخفاض الأعراض على العائل (Sinn *et al.*, 2008)، ويؤدي لفرط حساسية HR في النباتات غير العائلة  
(Choi *et al.*, 2013).

بينت دراسات عديدة أجريت في العقدين الماضيين أهمية هذه الجزيئة في تحريض مقاومة النباتات تجاه مجال  
واسع من الآفات سواء الحشرية أو الفطرية أو البكتيرية أو الفيروسية، وكذلك تعزيز نمو النباتات (Choi *et al.*, 2013).

**2-8-1 دور الهاربين كمحرّض لفطر الحساسية HR:** يعد تحريض فطر الحساسية باستخدام الهاربين أولى وظائفه المكتشفة؛ حيث أدى عند تطبيقه على أوراق التبغ بطريقة الترشيح بتركيز أقل من 500 µM إلى فطر حساسية وموت خلوي بمكان الحقن (Wei *et al.*, 1992; He *et al.*, 1993).

أدت معاملة أوراق *A. thaliana* وأوراق التبغ بالهاربين بتركيز 15 µg / ml إلى مقاومة مرتبطة بفطر الحساسية HR ضد *P. parasitica* و TMV (Peng *et al.*, 2003). أشارت دراسات عديدة أنّ هناك مناطق أحماض أمينية متخصصة في الهاربين هي السبب في تحريضه لفطر الحساسية (Choi *et al.*, 2013)، وأظهر تحليل مقارنة للمناطق المسؤولة عن تحريض فطر الحساسية أنها غنية باللوسين (Haapalainen *et al.*, 2011).

آلية التحريض غير محددة بدقة لكن هناك عدة تفسيرات محتملة منها: تخريب فيزيولوجية الغشاء من خلال أكسدة الفوسفوليبيدات الداخلة في تكوينه مما يؤدي لموت الخلية، ومن الآليات الأخرى تثبيط تصنيع الـ ATP من خلال تخفيض الناقلية الالكترونية في خلايا التبغ وليس عن طريق الضغط التأكسدي (burst oxydatif) (Xie and Chen, 2000)، إضافة لذلك حرّضت معاملة خلايا الـ *Arabidopsis* بالهاربين إلى تحرير cytochrome C من الميتوكوندريا إلى السيتوبلازما وتراكم أشكال الاوكسجين الفعالة (Krause and Durner, 2004)، إضافة لآليات أخرى مقترحة كتحرير مورثات لها علاقة بالـ HR مثل مورثة *Hin1* المرتبطة بالإمراضية وتفعيل بروتين الكيناز (Desican *et al.*, 2001).

تجدر الإشارة إلى أن بعض أنواع الهاربين تعيق الموت الخلوي، ينتج النوع *E. amylovora* نوعين من الهاربين HrpN و HrpW، حرّضت المعاملة بالتركيز 200 nM من كلا النوعين إلى تماوت خلوي شديد لـ *Arabidopsis* بينما المعاملة بالترشيح بتركيز 200 nM HrpN و 0.2 nM HrpW لم تحرض الموت الخلوي (Reboutier *et al.*, 2007) وأشارت دراسة بأن HrpW يمكنه فقط أن يثبط الموت الخلوي المحرّض من Harpin (Choi *et al.*, 2013).

**2-8-2 دور الهاربين في تحريض ردود الفعل الدفاعية في النبات:** عندما يُعَبَّر عن الهاربين في خلايا النبات أو يرش على النبات بتركيز متدنية فإنه يؤدي لردود فعل دفاعية لمرضات نباتية متنوعة منها الفطريات، البكتيريا والفيروسات وذلك دون أن يؤدي لفرط حساسية وموت خلوي (Choi *et al.*, 2013).

وأظهر التبغ المعدل وراثياً بمورثة هذا البروتين مقاومة للممرض *Botrytis cinerea* (Jang *et al.*, 2006)، والشوندر السكري المعدل وراثياً بمورثة الهاربين مقاومة للفيروس (Pavli) Beet necrotic yellow vein virus (et al., 2011).

خَفَضَ التطبيق بالرش الورقي للهاربين في نبات البندورة الإصابة بمرض *Phytophthora infestans* والعفن الرمادي *B. cinerea* (Fontanilla *et al.*, 2005).

بيّن (Capdeville *et al.*, 2003) انخفاض أعراض العفن الأزرق الذي يسببه الفطر *Penicillium expansum* في التفاح المعامل بالهاربين.

كما ظهر أنّ معاملة ما بعد القطاف للمشمش بمنتجات تجارية من الهاربين حاوية على 80 مغ / ل مادة فعالة أدى إلى انخفاض تطور الـ *Monilinia fructicola* (Boro *et al.*, 2011).

ذكر Li وآخرون (2012) بأنّ البروتين هاربين حرّض المقاومة الجهازية المكتسبة (SAR) في العناب الشتوي؛ فبعد معاملة أشجار العناب الشتوي ببروتين الهاربين، انخفض معدل الصدأ بشكل ملحوظ بنسبة تصل إلى 87.1% مقارنة بالشاهد المعامل بالماء، وتبين معهم بأنّ التركيز الأكثر فعالية من الهاربين كان 20 µg/ml.

حرّض رش نبات *Arabidopsis* إلى تعبير عن مورثات PR1 المرتبطة بالإمراضية وفعل المقاومة الجهازية المكتسبة مانحاً إياه مقاومة لعدة ممرضات منها *Peronospora parasitica* و *P.syringae* pv. *tomato* (Dong *et al.*, 1999).

أدت معاملة التبغ بالهاربين في دراسة أخرى إلى التعبير عن مورثات لها علاقة بردود الفعل الدفاعية مثل PR1a و PR1b (Peng *et al.*, 2004).

كما حرض تطبيق الهاربين على الرز مقاومة قوية ضد الممرض *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* والممرض *Magnaporthe grisea* في ظروف البيت الزجاجي والحقل (Chen *et al.*, 2008).

وذكر (Boro *et al.*, 2011) أنه عند استخدام الهاربين بتركيز 60 مغ /ل انخفضت أعراض مرض التبغ البكتيري للحمضيات المسبب من الممرض (*Xanthomonas axonopodis pv. citrumelo*) حتى الـ 55% في الـ citrumelo.

عوملت جذور الفجل بالهاربين وبعد 7 أيام لقحت الأوراق بـ *Xanthomonas campestris pv. amoraciae* strain 704b الممرضة لنبات الفجل، ثم قيمت شدة الأعراض البكتيرية بعد 6-8 أيام، حيث أدت معاملة الهاربين إلى انخفاض الأعراض بنسبة 41% مقارنة بالشاهد (Ahmad *et al.*, 2001).

لوحظ ارتفاع مستويات الجزيئات المرتبطة بالآلية الدفاعية عند نبات العناب المعامل بالهاربين وهي: حمض الصفصاف (SA)، و البيروكسيداز peroxidase (POD)، و polyphenol oxidase (PPO)، و phenylalanine ammonia lyase (PAL) وذلك مقارنة بالشاهد (Li *et al.*, 2012).

وذكر Peng وآخرون (2003) بأن الهاربين ينشط تصنيع البروتينات من أجل مسار حمض الصفصاف ومسار حمض الياسمين (Walters *et al.*, 2008)، اللذان يعدان الإشارة الرئيسية في المقاومة الجهازية المكتسبة والمقاومة الجهازية المحرّضة على التوالي (Kamle *et al.*, 2020).

حرّضت معاملة الهاربين لمعلق خلوي لنبات *Arabidopsis* التعبير عن المورثات الدفاعية التي ترمز لإنزيمات مثل (phenylalanine ammonia-lyase (PAL و anthranilate synthase (ASA1 وعلاوة على ذلك تبين أن الهاربين ينشط اثنين من الأنزيمات الشبيهة ببروتين كيناز Mitogen-Activated Protein

Kinase (MAPK) أنزيمات AtMPK4 و AtMPK6 في ال *Arabidopsis*، ويمكن تخفيض تفعيل AtMPK4 من قبل مثبط MAPKK (Livaja, 2005).

يملك الهاربين أيضا القدرة على تحريض ردود الفعل الدفاعية عند الحشرات، فمعاملة نبات *Arabidopsis* بالهاربين Harpin زادت من مقاومته لحشرات المن (Dong *et al.*, 2004)؛ حيث بعد أسبوع من تطبيق الهاربين كان عدد حشرات المن في النباتات المعاملة بالهاربين ثلث العدد الموجود على الشاهد غير المعامل.

وقد أشارت دراسات عديدة بأن تحريض الهاربين لردود الفعل الدفاعية ضد الحشرات من خلال مسارات الايتيلين في النبات (Choi *et al.*, 2013)، تتعرض مقاومة نبات *Arabidopsis* ضد حشرة من الخوخ الاخضر من خلال تفعيل إشارات الايتيلين باستخدام 2 Ethylene-insensitive (EIN2) المنظم الأساسي للإشارة الإيثيلين، لردود الفعل الدفاعية في النبات (LIU *et al.*, 2010).

## 2-8-3 دور الهاربين في تعزيز نمو النبات: ثبت أن الهاربين إضافة لتحريضه لفرط الحساسية HR ولردود

الفعل الدفاعية عند النباتات فإنه يعزز ويحفز نمو النبات (Choi *et al.*, 2013) حيث تزداد بشكل إيجابي الكتلة الحيوية للنبات ويزداد الإزهار والنضج المبكر وغلة المحصول وتحسن النوعية (Kothari and Patel, 2004).

فقد عزز رش شتلات ال *Arabidopsis* أو نقع بذورها بمحلول حاوي على الهاربين Harpin من نمو الشتلات (Dong وزملاؤه، 2004)، وأدى استخدام الهاربين على المجموع الخضري للرز إلى تعزيز نمو النبات ككل وتحسين إنتاجية الحبوب وزيادة الغلة (Chen *et al.*, 2008).

وأشارت دراسة حديثة بأن الهاربين زاد من تحمل نبات الرز للجفاف والاجهاد المائي (Zhang *et al.*, 2011)

درس (Li *et al.*, 2013) تأثير بروتين هاربين على نوعية ثمار العناب *Ziziphus jujuba* وصلاحياتها، حيث رشت أشجار العناب الشتاء بالهاربين بتركيز 20 ميكروغرام/ مل وقورنت بشاهد معاملة بالماء، وأظهرت المعاملة

تحسن معدل الفاكهة الجيدة بنسبة 158.5٪، مقابل انخفاض كبير في معدل الفاكهة الطرية بنسبة 54.6٪، وأثر على مؤشرات التخزين بشكل إيجابي حيث انخفض معدل التنفس وانخفض معدل الفساد وإنتاج الإيثيلين وذلك بعد تخزين الثمار لمدة 80 يوماً، أي أدت معاملة الهاربين إلى تطويل فترة بقاء الثمار يانعة ما بعد الحصاد، وعلاوة على ذلك، كانت معاملة الهاربين مفيدة للحفاظ على جودة ثمار العناب المخزنة في 0 س، حيث شجع على تأخير انخفاض السكر القابل للذوبان وفيتامين C ضمن محتويات الثمار، والتي تعد معايير مهمة لجودة الثمار أثناء التخزين. فتبين أنه بعد تخزين الثمار لمدة 80 يوماً، كان السكر القابل للذوبان وفيتامين C للثمار المعاملة بالهاربين أكثر من ضعف الموجود في الثمار الشاهد.

ووجد بدراسة عن تأثير الهاربين على نوعية الخس بعد حصاده، أنه عند رش الخس بالهاربين قبل حصاده ب 5 أيام حافظ على نوعيته وأطال من فترة حفظه بعد الحصاد (Fonseca *et al.*, 2009).

عمدت الكثير من دول العالم إلى إنتاج نباتات معدلة وراثياً بحيث ينتج النبات هذه الجزيئة عند تعرضه للإصابة بالآفة من خلال نقل المورثة المرمزة للهاربين عند الـ *Erwinia* ووضعها في النبات تحت سيطرة بروموتر مُحَرِّض inducible promoter بتأثير الإصابة أو جرح النبات (Jang *et al.*, 2006; Pavli *et al.*, 2011).

ولكن هناك بالمقابل وسيلة أخرى تمكن من الاستفادة من هذه الجزيئة في التطبيقات الزراعية من خلال انتاجها مخبرياً وتسويقها كمركب تجاري تُرش به النباتات لتحريض المقاومة تجاه مختلف الآفات آخذين بعين الاعتبار بأن هذه الجزيئة ليس لها أي تأثير سام على أي نوع من الكائنات الحية (Walters *et al.*, 2008).

**2-9 تنسيل مورثة الهاربين HrpN:** غالبا ما يكون هناك صعوبة في الحصول على البروتين من مصدره الأساسي وخاصة إذا كان أحد المسببات المرضية مثل البكتيريا *E. amylovora*، وللتغلب على هذه العقبة قام العديد من الباحثين بتنسيل المورثات ضمن نواقل اصطناعية مصممة لتعمل داخل الخلايا المستزرعة بسهولة، مثل بكتيريا *Escherichia coli* (Kielkopf *et al.*, 2021)، تتطلب عملية التنسيل العديد من الخطوات

والتقانات فأوضح Akhtar (2021) وجود عدة تقنيات هامة لإجراء تنسيل المورثة والتعبير عنها ومن ثم تنقية البروتين المؤشب، وهي باختصار استخدام الـ PCR لتضخيم المورثة المراد تنسيلها، مع ضرورة الانتباه لاستخدام أنزيم بلمرة عالي الموثوقية High-Fidelity، ومن ثم إجراء رحلان لمنتج الـ PCR على هلامه الاغاروز 1% للتأكد من حدوث التضخيم وينقى المنتج من الهلامة وتجرى سلسلة للقطعة المضخمة للتأكد من تسلسلها النكليوتيدي، تأتي بعدها خطوات الإدخال حيث تستخدم أنزيمات التقييد restriction enzymes التي تقوم بالقطع في مكان معين عند تسلسل نكليوتيدي محدد ضمن الناقل Vector ويتم اختيار أنزيمات التقييد بحيث تكون ملائمة للناقل والقطعة المراد إدخالها، ومن ثم يتم استخدام أنزيم الربط T4 DNA ligase لربط القطعة المراد إدخالها في موقع القطع ضمن الناقل، ثم يتم نقل البلاسميد أو أي ناقل مستخدم إلى سلالة بكتيرية كفوة بالتحويل مثل *E. coli* DH5 $\alpha$ ، تنمي هذه السلالة على أوساط مغذية حاوية على مضادات حيوية خاصة اعتماداً على البلاسميد المستخدم وبذلك لا تنمو على وسط النمو إلا السلالة المتحورة، يتم إجراء colony-pcr باستخدام بادئات متخصصة بالقطعة المدخلة للتأكد من صحة الإدخال، ثم يتم عزل البلاسميد المحور باستخدام أطقم العزل الجاهزة أو طريقة العزل بمحاليل قلوية، بعد عزل البلاسميد يتم إدخاله إلى سلالة التعبير البروتيني مثل *E. coli* (bl21) ثم تنميتها في دوارق الزرع ضمن شروط محددة كدرجة الحرارة وإضافة الـ IPTG Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside لحث التعبير، والخطوة الأخيرة تكون بتنقية البروتين المنتج واختيار الطريقة حسب البلاسميد المستخدم فقد يكون مزود بذيل الهيستيدين أو ذيل glutathione S-transferase وغيرها بمكان دخول القطعة، فتستخدم مواد تجذب هذه المواد كالايمديازول وغيره تبعاً للذيل الموجود، وأخيراً تتم دراسة خصائص البروتين المؤشب المنقى باستخدام عدة طرق مثل SDS-PAGE والبصمة المناعية للبروتين.

هناك العديد من النواقل المستخدمة في عملية التنسيل، الأكثر استخداماً ورواجاً هو البلاسميدات المصنعة ويتم اختيار الناقل عادة تبعاً لمعايير عدة: مواقع التقييد أو القطع المتوفرة في الناقل، مدى التعبير عن البروتين،

(Akhtar, 2021)، ويجب أن يحتوي الناقل المواقع المطلوبة لعملية التنقية اللاحقة كذيل الهيستيدين أو glutathione S-transferase أو غيرهم (Scheich et al., 2003).

تستخدم بكتيريا *E. coli* كمضيف لقطع الدنا المراد تنسيلها لعدة أسباب أهمها معدل النمو السريع، الإنتاجية العالية من البلاسميد، وكفاءة تحويل أكبر، وتعد السلالة DH5α هي الأكثر شيوعاً واستخداماً كسلالة تحويل (Kostylev et al., 2015)، من ناحية أخرى تعد السلالة *Escherichia coli* BL21 أحد أهم المضيفات البكتيرية المستخدمة على نطاق واسع كسلالة تعبير بروتيني أي لإنتاج البروتين المؤشب وذلك لكونها سريعة بمعدل نموها، وهناك معرفة تامة بمورثاتها وتركيبها (Jeong et al., 2015).

أجري تنسيل المورثة المرمزة للهاربين *Hrp N* في سلالة *Escherichia coli* (E. coli K-12)، لتنتج هذه السلالة المحورة كميات كبيرة من الهاربين، ثم عزله وتنقيته من وسط النمو البكتيري، وأنتج بروتين الهاربين كمستحضر تجاري بحيث أن البروتين هاربين المنتج تجارياً مطابق للبروتين الذي ينتج طبيعياً. تعد السلالة *E. coli* K-12 المستخدمة سلالة غير ممرضة، غير قادرة على النمو في البيئة، بعد الإنتاج يتم تركيز الهاربين من وسط النمو من *E. coli* المحورة، ومن ثم قتل الخلايا البكتيرية وإزالتها من المنتج لتسويقها (Walters et al., 2008).

يوجد بروتين الهاربين تجارياً تحت عدة مسميات *Messenger™*، *Proact™*، *Axiom™*.

سجل *Messenger™* مع وكالة حماية البيئة، في نيسان 2000، وهو مستحضر حبيبي قابل للبلل يحتوي على 3% من البروتين هاربين، بينما وصف *Proact™* بأنه الجيل الثاني من منتجات الهاربين ويباع حالياً للاستخدام على القطن والذرة والرز. وبالإضافة إلى ذلك يتم تسويق *N-Hibit™* لتطبيقه على بذور القطن لتحريض مقاومتها ضد النيماتودا (Walters et al., 2008).

صنفت وكالة حماية البيئة منتج *Messenger™* على أنه مبيد منخفض الخطورة low risk pesticide وهو يقع في التصنيف "معرض مقاومة للنبات (PDB) plant defense booster" (Kothari and Patel, 2004).

حسب وكالة حماية البيئة الأمريكية فإن مخاطر الصحة البشرية الناجمة عن هاربين ضئيلة إلى درجة عدم وجود أي خطورة؛ فلم تظهر أي آثار ضارة في اختبارات السمية على الثدييات. إضافة إلى أنه يطبق بمعدلات منخفضة ويتحلل بسرعة في الحقل، وبالتالي تقليل الأثر المتبقي على المحاصيل المعاملة. الخطورة على العاملين في تطبيقه منخفضة جداً، وتنخفض أكثر عند اتباع إجراءات الأمان الاعتيادية المطلوبة ( Environmental Protection Agency, 2019).

اعتبرت وكالة الحماية البيئية الأمريكية أن الهاربين لا يسبب أي ضرر على البيئة؛ لأنه يطبق بمعدلات منخفضة ويتحلل بسرعة بعد التطبيق، وبذلك فإنه كمية قليلة منه أو ما لا يذكر يمكن أن يصل للأرض أو سطح المياه. هذا عدا عن أن الهاربين لم يظهر أية آثار سلبية على الطيور والأسماك واللافقاريات المائية وعلى نحل العسل والنباتات غير المستهدفة، والطحالب. ولذلك فالمخاطر على الحياة البرية والحشرات النافعة قليلة إلى حد ما لعدم وجودها (Environmental Protection Agency, 2019).

## الفصل الثالث

### مواد البحث وطرائقه

### Materials and Methods

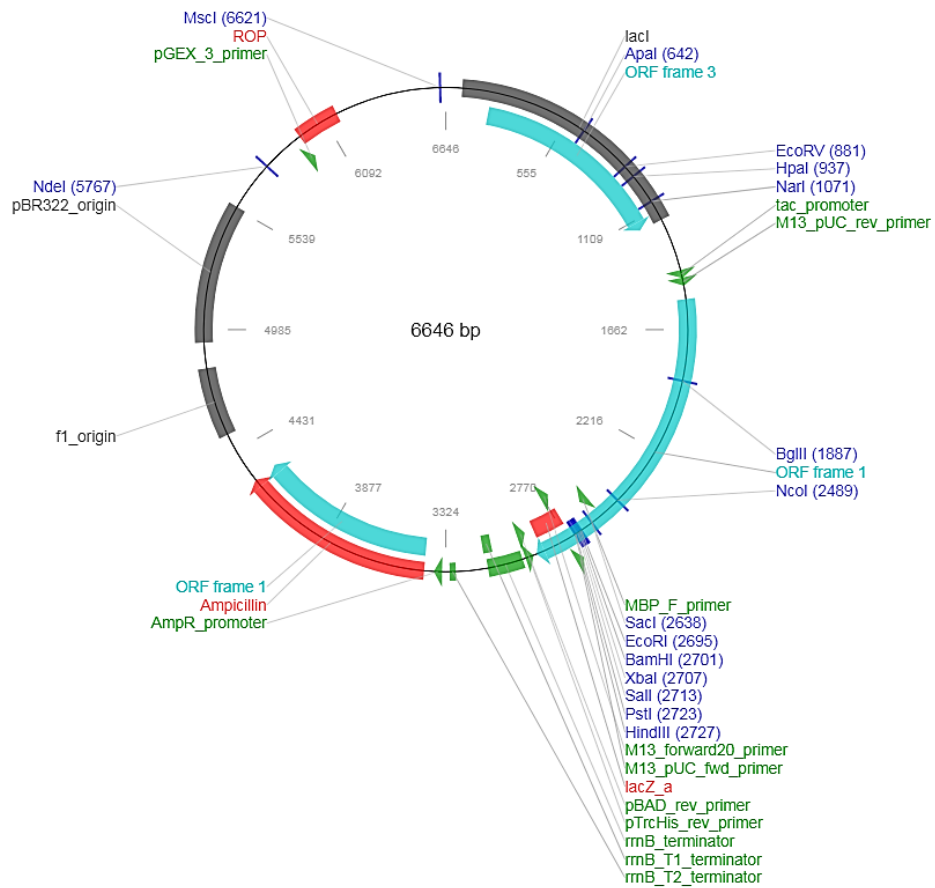
### 3- مواد البحث، وطرائقه Materials and Methods

**3-1 موقع إجراء البحث:** أجري تنسيل مورثة الـ *HrpN* والتعبير عن بروتين الهاربين وتنقيته في هيئة الطاقة الذرية - سورية بإشراف د. أنطونيوس الداود، واختبر البروتين ودرست خواصه في مخبر البيولوجيا الجزيئية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق ومخبر أمراض النبات البكتيرية، زرعت بذور القمح اللازمة للاختبارات في البيت الزجاجي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، أجريت التجارب المخبرية لدراسة الفعالية الأنزيمية في مخبر أمراض النبات البكتيرية ومخبر البيولوجيا الجزيئية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق.

**3-2 المادة النباتية:** أصناف القمح الصنف شام 3 والصنف بحوث 5 و الصنف شام 6

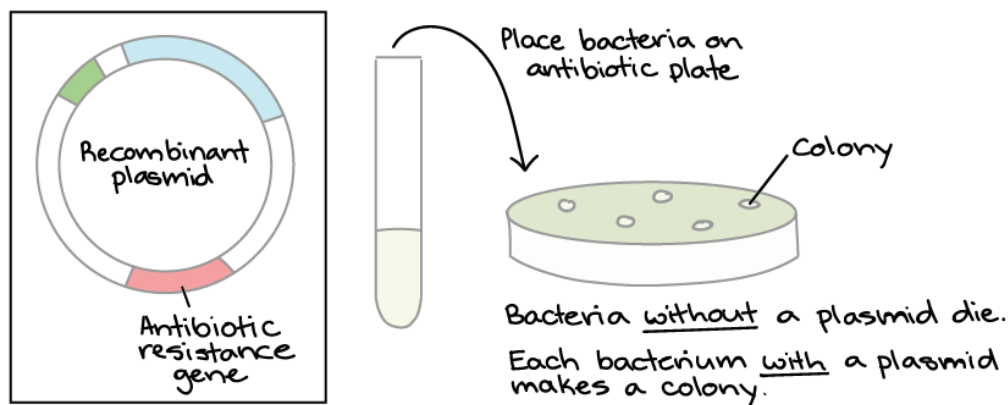
**3-3 المحفز المدروس:** بروتين الهاربين المؤشب Harpin، مصدره الأساسي بكتيريا *E. amylovora*

**3-4 تنسيل مورثة الـ *HrpN* :** أجري العمل كاملاً في هيئة الطاقة الذرية - سورية بإشراف د. أنطونيوس الداود، حيث أجري تفاعل PCR لمورثة *HrpN* من عزلة محلية للبكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة للفة النارية على التفاحيات، باستخدام بادئات متخصصة بهذه المورثة واستخدم أنزيم بلمرة عالي الموثوقية ( Taq polymerase high fidelity) لتقليل حدوث خطأ في تسلسل النكليوتيدات أثناء التضخيم، من ثم أجري رحلان لمنتج الـ PCR على هلامه الاغاروز 1% للتأكد من حدوث التضخيم، وأجريت تنقية منتج التضخيم من باقي مكونات تفاعل الـ PCR باستخدام طاقم للتنقية، ثم أدخلت القطعة المراد تنسيقها باستخدام أنزيمات تقييد Restriction enzymes ملائمة للناقل والقطعة المراد إدخالها و أنزيم الربط T4 DNA ligase ضمن البلاسميد الناقل Pmal C2 الشكل (6) الذي يعطي ذيل (tag) maltose-binding protein المهم للتنقية اللاحقة للبروتين.



الشكل (6) الخريطة الوراثية للبلاسميد Pmal C2 (addgene.org/vector-database/3509, 2020)

أدخلت نواتج الربط (البلاسميد المحور) لسلاطة *E.coli* DH5 $\alpha$  الكفاءة بالتحويل، وتم التأكد من دخول البلاسميد المحور بمورثة *HrpN* إلى السلاطة *E.coli* DH5 $\alpha$  من خلال تنمية البكتيريا المحورة على وسط زرع انتخابي يحوي المضاد الحيوي الكاربينيسيلين (Carbenicillin 50ميكروغرام/مل)؛ حيث أن البلاسميد Pmal C2 يحوي مورثة مقاومة للمضاد الحيوي وبالتالي البكتيريا الحاوية على بلاسميد Pmal C2 فقط ستشكل مستعمرات في وسط الزرع الشكل (7).



الشكل (7): مخطط تمثيلي لكيفية التأكد من دخول البلاسميد المحور بمورثة *HrpN* إلى السلالة *E. coli* DH5α

(<https://www.khanacademy.org/>, 2020)

أجري colony-PCR باستخدام بادئة من مورثة الهاربين وبادئة من البلاسميد فتظهر الحزمة بالحجم المطلوب، بعد ذلك استخلص البلاسميد المحور وأدخل إلى السلالة البكتيرية *E. coli* bl21 وتم التأكد من عدم وجود خطأ في مكان الدخول عن طريق إجراء سلسلة لقطعة الـ *HrpN* المنسلة بعد إجراء تفاعل PCR باستخدام البادئات المتخصصة بمورثة الهاربين.

درس تعبير البروتين لمورثة *HrpN* ضمن السلالة *E. coli* bl21 واختيرت الشروط الامثل لذلك من درجة الحرارة وفترة الحضانة وتركيز الـ IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)، درجة الحرارة 37 س وفترة الحضانة كانت ما بين 4-6 ساعات وذلك بعد إضافة الـ IPTG الذي أضيف عند OD البكتيريا 0.35، وتمت إضافة الـ IPTG بتركيز 1 ميلي مولار، نمت البكتيريا ضمن هذه الشروط المثالية ضمن دوارق واستخلصت البروتينات منها؛ حيث أخذت البكتيريا وثقل المزيج ثم فجرت الخلايا (الرسابة) باستخدام المكبس الفرنسي French press ضمن محلول موقى 10 ميلي مولار فوسفات الصوديوم.

3-5 تنقية بروتين الهاربين: مرر الناتج على عمود كروماتوغرافي (عمود اميلوز *amylose resin*) حيث يوجد انجذاب Affinity ما بين ذيل maltose-binding protein والأميلوز وبالتالي تتم تنقية بروتين الهاربين

من بقية البروتينات الأخرى، أُضيف للعمود بعد ذلك محلول يحوي EDTA وملح تركيزه عالي ينافس المالتوز وبالتالي الحصول على البروتين النقي لكن مع بقاءه مرتبط بالذيل maltose-binding protein.

استخدم العامل Factor Xa Protease للتخلص من ذيل maltose-binding protein ؛ حيث يقوم بقطع المنطقة بين الهاربين و maltose-binding protein، أعيد تمرير الناتج مرة أخرى على عمود الكروموتوغرافي *amylose resin* لتقوم حبيبات الاميلوز في العمود بالارتباط بالتاغ ( maltose-binding protein) بينما يخرج بروتين الهاربين من العمود بشكل نقي، تم قياس تركيزه باستخدام طريقة Bradford (1976) بالمقارنة مع محاليل عيارية من Bovine serum albumin (BSA)، أخذت القراءات على طول موجة 595 نانومتر.

### 3-6 دراسة خصائص بروتين الهاربين المؤشب:

قياس وزن البروتين الجزيئي والتأكد من نقاوته باستخدام تقانة الرحلان الكهربائي على هلامة متعدد الأكريل أمايد Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) وصبغ الهلامة بأزرق الكوماسي، حيث حضرت الهلامة وفق Laemmli (1970)، من المحاليل الموجودة في الجدول (4):

الجدول (4) مكونات هلامة متعدد الأكريلاميد اللازمة لإجراء رحلان SDS-PAGE

| المكون Composition                  | هلامة التركيز Concentration gel | هلامة الفصل Separation gel |
|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| AcrylAmide/Bis<br>Acrylamide (%40)* | 1 ml                            | 5 ml                       |
| Tris-Hcl 0.5M, pH6.8                | 2.5 ml                          | –                          |
| Tris-Hcl 1.5M, pH8.8                | –                               | 5 ml                       |

|                                |         |         |
|--------------------------------|---------|---------|
| ماء مقطر dH2O                  | 6.45 ml | 9.89 ml |
| TEMED                          | 10 µl   | 10 µl   |
| AmoniumPerSulfate<br>(APS) 10% | 50 µl   | 100 µl  |
| SDS 10%                        | 100 µl  | 100 µl  |

\*محلول 40% AcrylAmide/Bis Acrylamide (1/37.5 g 100 ml ماء مقطر)

وحضرت محاليل الرحلان حيث استخدم محلول رحلان الغلايسين 1X ph 8.3 (Tris-base 3g /l, ) glycine 14.4g /l, 1 g SDS وأكمل الحجم إلى 1000 مل، ومحلول تحميل العينات (4 ml dH2O, 1ml Tris-Hcl 0.5M pH6.8, 800 µl glycerol, 400µl β-mercaptoethanol, 1.6ml SDS 10% , 1mg promophenol blue).

حقنت عينة بروتين الهاربين وحقن معلم وزن جزيئي Chromatein prestained Protein ladder من شركة Vivantis لمعرفة الوزن الجزيئي، لونت الهلامية بعد إجراء الرحلان باستخدام محاليل تلوين البروتين للكشف عن البروتينات الكلية بصبغة الكوماسي، حيث وضعت الهلامية بمحلول التثبيت Fixation لمدة 30 دقيقة (40% 10% acetic acid + Ethanol)، ثم نقلت الهلامية 20 دقيقة لمحلول الصبغ حيث حضر بمزج محولين بنسبة 1:1 [100 مل محلول 1 (0.2 % Coomassie Brilliant blue R 250 + 90 % Ethanol)، 100 مل محلول 2: (20% acetic acid)]، ثم وضعت في محلول التثبيت 30 ثا، وأخيرا وضعت ليوم كامل في محلول إزالة الصبغ destaining (10% acetic acid + 20% Ethanol).

اختبار الثباتية الحرارية للبروتين: اختبرت ثباتية بروتين الهاربين الحرارية للتأكد من خصائصه؛ حيث وضع البروتين في حمام مائي بدرجات حرارة مختلفة (30، 45، 60، 70، 80 س) لمدة 5 دقائق، ثم حقنت كل

معاملة حرارية في أوراق التبغ بعد تبريد البروتين لدرجة حرارة الغرفة وأخذت قراءة ردة فعل فرط الحساسية على التبغ بعد 24 ساعة كون فرط الحساسية هي أولى الصفات المكتشفة للهاربين.

### 3-7 تقييم كفاءة بروتين الهاربين المؤشب في تحريض أنزيم السوبروكسيد دسموتاز Superoxide dismutase (SOD) في القمح:

زرعت بذور قمح للصنف (شام 3) تكفي لأزمة الجمع المختلفة (9 أزمات) كل زمن 3 مكررات بحيث أن كل مكرر عبارة عن 3 نباتات؛ أي 81 نبات عومل ببروتين Harpin ومثلها للشاهد (الماء) وذلك لتجربة قياس الفعالية الأنزيمية باستخدام المطياف الضوئي والرحلان الكهربائي، وزرعت نفس الكمية لتجربة دراسة التعبير المورثي لأنزيم الـ SOD، تمت معاملة البادرات رشاً بعمر أسبوعين ببروتين الهاربين المؤشب وبالشاهد (الماء) حيث استخدم تركيز الهاربين الذي لم يؤد لفرط حساسية (1 غ/ل)، جمعت النباتات المعاملة بالهاربين والشاهد (الماء) على فترات زمنية مختلفة بعد الرش (0، 1، 2، 4، 18، 24، 72، 96) ساعة، ووضعت في الآزوت السائل مباشرة بعد الحصاد لتحفظ كل على حدة بالتجميد على درجة حرارة 70- س.

### 3-7-1 استخلاص البروتينات الكلية وقياس تركيزها:

حضرت الخلاصة النباتية من كل عينة من العينات المحفوظة، اعتماداً على طريقة Gholamnezhad وزملاؤه (2016)؛ حيث طحن 1 غ عينة نباتية مع 3 مل محلول استخلاص البروتين [Tris-HCl pH=7 (Tris base 50mM, NaCl 50mM),  $\beta$ -MercaptoEthanol 5mM, PVPP 1%, 0.01% Triton مع تعديل الحموضة باستخدام 1N HCl] ثم أجري التثقيب لمدة 15 د على درجة حرارة 4 م بسرعة 16000 g باستخدام مثقلة (Thermo SCINTIFIC) وأخذت الخلاصة البروتينية (الرائق) لأنبوب جديد.

قيس تركيز البروتين الكلي في الخلاصات البروتينية باستخدام طريقة Bradford (1976) بالمقارنة مع محاليل عيارية من بروتين المصل البقري (BSA) Bovine Serum Albumine، حيث حضرت محاليل عيارية من الـ BSA بتركيزات (0، 31.25، 62.5، 125، 250، 500، 1000، 2000)  $\mu\text{g/ml}$  وقيست الامتصاصية لها

على طول موجة 595 نانو متر، ومن ثم رسم بواسطتها المنحنيات المعيارية وأخذت معادلات الخطية لها والتي من خلالها عرف تركيز البروتين الكلي.

### 3-7-2 دراسة فعالية أنزيم SOD باستخدام جهاز المطياف الضوئي:

استخدم محلول موقى من فوسفات الصوديوم (pH=7.5، 50mM) محضر من معايرة محلول قلوي Solution A (9.3-9) pH : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O تركيز 50 mM مع محلول حامضي Solution B (4.2-4.5) pH : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O تركيز 50mM.

أجري التفاعل للخلاصات الطازجة في أنابيب زجاجية بحجم نهائي 3 مل وذلك حسب الجدول (5) حيث أضيف لمحلول فوسفات الصوديوم 50 mM محلول ميثيونين 13 µM، 63 µM من NBT، خلاصة أنزيمية (العينة النباتية) 20 µl و 1.3 µM ريبوفلافين، ثم عرضت الأنابيب لإضاءة قوية 500 لوكس لمدة 15 دقيقة، واستخدم شاهد ايجابي بدون عينة (غير حاوي على أنزيم الـ SOD) وشاهد سلبي مع عينة لكن غير معرض للضوء (Giannopolitis and Ries, 1977).

الجدول (5) مكونات وكميات مواد التفاعل اللازمة لقياس فعالية أنزيم الـ SOD في الخلاصات البروتينية

| شاهد إيجابي | شاهد ظلام | العينة مع ضوء | المحاليل                              |
|-------------|-----------|---------------|---------------------------------------|
| 2250        | 2230      | 2230          | محلول فوسفات الصوديوم<br>pH=7.5، mM50 |
| 250         | 250       | 250           | ميثيونين 13 mM                        |
| 250         | 250       | 250           | µM 63 NBT                             |
| -           | 20        | 20            | خلاصة أنزيمية                         |
| 250         | 250       | 250           | ريبوفلافين 1.3 mM                     |

أجريت اختبارات الفعالية الأنزيمية لأنزيم Superoxide dismutase بواسطة جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 560 نانومتر وذلك لجميع التفاعلات التابعة للخلاصات البروتينية للعينات المعاملة بالهاربين والشاهد لجميع أزمنة أخذ العينات وحسبت الفعالية من القانون التالي:

$$\bullet \text{ نسبة ارجاع NBT} = \text{د} / (\text{DO}_{\text{Formazan sample}} - \text{DO}_{\text{Formazan Control}}) / \text{ زمن التفاعل (د15)}$$

وذلك في حجم العينة في التفاعل ثم حسبت في 1 مل خلاصة بروتينية ومن ثم في 1 مغ بروتين

مع حساب المتوسطات والانحراف المعياري وحللت التجربة إحصائياً باستخدام برنامج SPSS17 عن طريق اختبار Anova، حفظت الخلاصات في المجمدة بعد إضافة 100 µl غليسيرول لـ 900 µl خلاصة بروتينية وذلك لدراسة الفعالية الأنزيمية عن طريق الرحلان الكهربائي.

### 3-7-3 دراسة فعالية أنزيم SOD عن طريق الرحلان الكهربائي العمودي native-PAGE: استخدمت

الخلاصات المجمدة مع 10% غليسيرول وتم حقن عينات متساوية التركيز من البروتين في هلامة متعدد الأكريل أمايد Poly AcylAmide (10% Acrylamide/bisacrylamide) وفق Laemmli (1970)، لمدة 4 ساعات على 200 فولت (Delannoy *et al.*, 2005)، ثم أجري الصبغ السالب للهلامة بمحلول موقى من فوسفات الصوديوم (50mM, ph 7.5-7.8) مدة 10 د، ثم إلى محلول محلول فوسفات الصوديوم (50mM, ph 7.5-7.8) ضمنه ريبوفلافين، TEMED كمولد للانيون سوبركسيد عند وجود الضوء (Voloudakis *et al.*, 2006)، تم التحضين بالظلام لـ 30 د، نقلت بعدها لمحلول فوسفات الصوديوم (50mM, ph 7.5-7.8) مع وجود NBT Nitro blue tetrazolium (25 مغ) كمستقبل للانيون سوبركسيد (Voloudakis *et al.*, 2006) لمدة 20 د ثم وضعت في محلول موقى من فوسفات الصوديوم مع التعريض لضوء قوي 500 لوكس.

قرئت النتيجة عن طريق كثافة الحزم الشفافة البيضاء ضمن الهلامة التي ستأخذ لون الفورمازان المتشكل من تفاعل الـ NBT مع الانيون الانيون سوبركسيد، حيث ستؤدي المنافسة بين انزيم SOD والـ NBT على الانيون سوبركسيد لضعف التفاعل اللوني وبالتالي ظهور الحزم الشفافة أي زيادة كثافة هذه الحزم تعبر عن زيادة في فعالية أنزيم الـ SOD.

### 3-7-4 دراسة التعبير المورثي لمورثة الـ SOD: عزل الحمض النووي الريبي RNA لعينات القمح المحفوظة

بالتجميد على -70°س والمعاملة مسبقاً بالرش بالهاربين والشاهد (الماء) والمجموعة في ازمدة حصاد مختلفة،

حيث استخدم TRI Reagent من شركة SIGMA وذلك حسب تعليمات الشركة الصانعة، أجري رحلان لل RNA المعزول على هلامة آغاروز 1% خالية من RNase وباستخدام محلول رحلان TBE 1X وذلك للتأكد من نوعية الـ RNA المعزول (Keshkeih, 2014)، ثم أجري اختبار rt-PCR باستخدام طاقم RevertAid First Strand cDNA Synthesis من شركة Thermo باستخدام بادئ oligo dT الذي سيرتبط بذيل الأدينين المميز للحمض الريبسي الرسول mRNA، حيث حضر التفاعل من 1 ميكروغرام total RNA و 1 µl من بادئ oligo(dT)<sub>18</sub> وأكمل الحجم إلى 12 ميكروليتر بالماء الخالي من النوكلياز ثم أضيف 4 ميكروليتر من (5X Reaction Buffer) مع 1 ميكروليتر من (RiboLock Rnase Inhibitr 20u/µl) و 2 ميكروليتر من dNTP Mix 10 mM و 1 ميكروليتر من أنزيم RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase 200u/µl بحيث يصبح حجم التفاعل 20 ميكروليتر، خلط المزيج بلطف ثم حضن المزيج لمدة 60 دقيقة على درجة 42 س ثم أنهى التفاعل بالتسخين على درجة 72 س لمدة 5 دقائق، بعد انتهاء العمل خزن الـ cDNA على درجة -20 س حيث أجريت تفاعلات الـ PCR في اليوم التالي وذلك لمورثة zn-SOD ومورثة Actin كشاهد داخلي دائم التعبير عن نفسه باستخدام زوج البادئات المتخصصة بهما الجدول (6)

الجدول (6) التسلسلات النكليوتيدية للبادئات المستخدمة في دراسة التعبير المورثي لمورثتي الـ zn-SOD والـ Actin

| المرجع                       | التسلسل النكليوتيدي                                        | البادئات   |
|------------------------------|------------------------------------------------------------|------------|
| Baek and Skinner, 2003       | F 5'→3:GTTGTTGGGAGAGCGTTTGT<br>R 5'→3:GCAAGTCTTCCACCAGCATT | zn-SOD     |
| Chitnis <i>et al.</i> , 2016 | F 5'→3:GCTGGAAGGTGCTGAGGGA<br>R 5'→3:GCATCGCCGACAGGATGAG   | Taβ -actin |

أجري تفاعل الـ PCR (25 µl حجم نهائي) باستخدام Master Mix 2x من شركة (Kappa) و 12.5 pmol من البادئ المباشر For 10 ميكرومولر، و 12.5 pmol من البادئ غير المباشر Rev 10 ميكرومولر، و 5 ميكروليتر من cDNA تركيز 10 نانوغرام/ميكروليتر وأكمل الحجم بالماء المقطر معقم.

و أجري تفاعل PCR باستخدام جهاز المدور الحراري (Bio-Gener) وفق البرامج المبينة في الجدول (7).

الجدول (7) برامج الدورات الحرارية لتفاعلات الـ PCR المدروسة لتضخيم مورثتي *Zn-SOD* و *Actin* – Taβ

| Taβ – Actin |                 | Zn-SOD |                 |            |                  |
|-------------|-----------------|--------|-----------------|------------|------------------|
| الزمن       | درجة الحرارة س° | الزمن  | درجة الحرارة س° |            |                  |
| 3 د         | 94              | 3 د    | 94              |            | فصل سلسلتين اولي |
| 1 د         | 94              | 1 د    | 94              | 35<br>دورة | فصل السلسلتين    |
| 1 د         | 56              | 1 د    | 53              |            | التحام البادئات  |
| 30 ثا       | 72              | 30 ثا  | 72              |            | استطالة          |
| 10 د        | 72              | 10 د   | 72              |            | استطالة نهائية   |

بعد الإنتهاء من تفاعل الـ PCR أجري الرحلان على هلامة آغاروز 1.5% وباستخدام محلول رحلان TBE

1X، وثقت النتيجة باستخدام جهاز توثيق الهلامات Cleaver وسجلت النتائج عن طريق ظهور الحزمة من عدمه وكثافة الحزمة الناتجة.

### 3-8 تقييم كفاءة بروتين الهاربين في تحريض فعالية أنزيم البيروكسيداز Peroxidase (POD) في

القمح:

زرعت بذور قمح للصنف (شام 3) بنفس شروط وعدد البذار والمعاملات للتجربة السابقة "دراسة فعالية أنزيم SOD"، كما استخلصت البروتينات الكلية وقيست تراكيزها بنفس الطريقة اعتماداً على Gholamnezhad وآخرون (2016) واستخدام طريقة Bradford (1976).

3-8-1 دراسة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD بالمطياف الضوئي: حُضِر محلول التفاعل من محلول فوسفات الصوديوم (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) pH=7، 50 mM و 0.1% غاياكول + 0.03% بيروكسيد الهيدروجين H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، وأضيف 20 µl خلاصة بروتينية طازجة لـ 980 µl

محلول التفاعل، وأخذت القراءات مباشرة بواسطة جهاز المطياف الضوئي (WPA spectrophotometer) على طول موجة 470 نانومتر كل 10 ثا قراءة، وذلك للعينات السابقة المعاملة بالهاربين والشاهد لجميع أزمنة أخذ العينات.

أخذت القراءات على مدار 2 دقيقة واختيرت القراءات التي تعطي خط مستقيم، وحسبت فعالية البيروكسيداز من المعادلة التالية (Martinez *et al.*, 1996):

$$\text{فعالية البيروكسيداز POD (نانوكاتال / مغ بروتين)} = \frac{[E_{\text{tetra guaicol}}] * [\text{حجم التفاعل (مل)} / 1000] * [1000 / \text{حجم العينة في التفاعل (مل)}] * [10^6 / 60] (\text{تركيز البروتين (مل)})}{[\text{حجم التفاعل (مل)}]}$$

$$E_{\text{tetra guaicol}} : \text{معامل الامتصاصية} = 26.6 * 10^3$$

حللت النتائج إحصائيا باستخدام برنامج SPSS17 عن طريق اختبار Anova.

حفظت الخلاصات البروتينية بعد دراسة الفعالية الأنزيمية باستخدام المطياف الضوئي في المجمدة -70 س بعد إضافة 100 µl غليسيرول لـ 900 µl خلاصة بروتينية وذلك لدراسة الفعالية الأنزيمية عن طريق الرحلان الكهربائي.

### 3-8-2 دراسة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD عن طريق الرحلان الكهربائي العمودي native-PAGE:

استخدمت الخلاصات المجمدة مع 10% غليسيرول وتم حقن عينات متساوية التركيز من البروتين في هلامة متعدد الأكريل أميد Poly AcylAmide (10% Acrylamide/bisacrylamide) وفق Laemmali (1970)، لمدة 4 ساعات على 200 فولت، بعد اجراء الرحلان الكهربائي أجري صبغ الهلامة كما ذكر في (Keshkeih *et al.*, 2019) حيث تم تجهيز محلولين: محلول (1) مكون من 200 مل محلول فوسفات الصوديوم ((Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O)) (pH 6، 50mM)، 0.2% غايكول Guaiacol،

0.03% بيروكسيد الهيدروجين H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، محلول (2) مكون من 0.05 غ من 3-amino-9-ethylcarbazole، 20 مل Dimethylformamide (DMF)، مزج المحلولين وحضنت الهلامية في المزيج لـ 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة حتى حدوث التفاعل اللوني حيث تظهر النتائج على شكل حزم ملونة بلون أحمر.

### 3-8-3 دراسة التعبير المورثي لمورثة *Glutathione Peroxidase (GPX)* إحدى المورثات المسؤولة

عن أنزيم البيروكسيداز :

استخدم في هذه الدراسة الـ cDNA المحضر في تجربة "دراسة التعبير المورثي بمورثة الـ *SOD*"، أجريت تفاعلات الـ PCR لمورثة *GPX* بالمقارنة مع مورثة *Actin* -  $\beta$  Ta كشاهد داخلي دائم التعبير عن نفسه باستخدام أزواج البادئات المتخصصة بهما الجدول (8)

الجدول (8) التسلسلات النكليوتيدية للبادئات المستخدمة في دراسة التعبير المورثي لمورثتي الـ *GPX* والـ *Actin*

| المرجع                       | التسلسل النكليوتيدي                                          | البادئات          |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------|
| Baek and Skinner, 2003       | F 5'→3: CCCCCTGTACAAGTTCCTGA<br>R 5'→3: GTCAACAACGTGACCCTCCT | GPX               |
| Chitnis <i>et al.</i> , 2016 | F 5'→3: GCTGGAAGGTGCTGAGGGA<br>R 5'→3: GCATCGCCGACAGGATGAG   | Ta $\beta$ -actin |

أجري تفاعل الـ PCR (25  $\mu$ l حجم نهائي) باستخدام Master Mix 2x من شركة (Kappa) و 12.5 pmol من البادئ المباشر For (10  $\mu$ M)، و 12.5 pmol من البادئ غير المباشر Rev (10  $\mu$ M)، و 5  $\mu$ l من cDNA تركيز 10 نانو غرام/ميكروليتر وأكمل الحجم بالماء المقطر معقم، استخدم جهاز الدور الحراري (Bio-Gener) لإتمام التفاعل وفق البرامج المبينة في الجدول (9).

الجدول (9) برامج الدورات الحرارية لتفاعلات الـ PCR المدروسة لتضخيم مورثتي GPX و Ta $\beta$  - Actin

| Ta $\beta$ - Actin |                 | GPX   |                 |            |                  |
|--------------------|-----------------|-------|-----------------|------------|------------------|
| الزمن              | درجة الحرارة س° | الزمن | درجة الحرارة س° |            |                  |
| 3 د                | 94              | 3 د   | 94              |            | فصل سلسلتين اولي |
| 1 د                | 94              | 1 د   | 94              | 35<br>دورة | فصل السلسلتين    |
| 1 د                | 56              | 1 د   | 53              |            | التحام البادئات  |
| 30 ثا              | 72              | 30 ثا | 72              |            | استطالة          |
| 10 د               | 72              | 10 د  | 72              |            | استطالة نهائية   |

بعد الإنتهاء من تفاعل الـ PCR أجري الرحلان على هلامة آغاروز 1.5% وباستخدام محلول رحلان TBE 1X ووثقت النتيجة باستخدام جهاز توثيق الهلامات Cleaver، وسجلت النتائج عن طريق ظهور الحزمة من عدمه وكثافة الحزمة الناتجة.

**3-9 تحديد تركيزات الفلافونويد الكلية:** قدرت تراكيز الفلافونويد الكلية في عينات قمح شام 3 معاملة بالرش ببروتين الهاربين مقارنة بعينات معاملة بالشاهد الماء المقطر لـ 5 أزمنة حصاد (0، 24، 48، 72، 96 سا) بعد المعاملة، واستخدمت الطريقة اللونية لكوريد الألومنيوم حسب (CHANG *et al.*, 2002) لتحديد محتوى الفلافونويد لأوراق القمح، حضر تخفيف من مستخلصات أوراق القمح وفق (MOORE *et al.*, 2006) حيث طحن 1 غ أوراق القمح لكل عينة وحضر مستخلص اسيتوني (10 مل)، أخذ 0.5 مل من المستخلص ومزج مع 1.5 مل إيثانول 95٪، ثم أضيف 0.1 مل من كلوريد الألمنيوم 10٪، و 0.1 مل من خلات البوتاسيوم 1 مولار و 2.8 مل من الماء المقطر، حُصّن المزيج على درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، أخذت قراءات الامتصاصية للمزيج على طول موجة 415 نانومتر، تم التعبير عن القيم على أنها ميكروغرام/غ وزن جاف (DW)، كررت كل عينة 3 مرات وحللت التجربة إحصائياً باستخدام برنامج SPSS17 عن طريق اختبار Anova.

**3-10 التأثير في إنبات القمح ونموه:** عقت بذور القمح سطحياً بكحول ايتيلي 70% لمدة 3 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم 3 مرات، نعت بذور القمح بالهاربين والماء كشاهد لمدة 24 ساعة كل معاملة 100 بذرة، وزعت البذور ضمن طبق بتري على ورق نشاف مبلل، بحيث وضع في كل طبق 5 بذور، وحضنت الأطباق على درجة 20 س°. قسمت الأطباق لمجموعتين، المجموعة الأولى أخذت القراءات بعد أسبوع حيث حددت نسبة الإنبات وقياس طول الجذير والسويقة وعدد الجذور كمؤشرات أولية على تأثير الهاربين في قوة النمو، المجموعة الثانية نقلت البذار المنبئة إلى أصص صغيرة قطر 10 سم مملوءة إلى ثلثها بالتورب وبعد 3 أسابيع أخذت أوزانها الرطبة والجافة، بعد أخذ قراءات الوزن الرطب للبادرات، أخذ وزن 100 مغ من كل معاملة وبقدر 3 مكررات، طحنت هذه العينات باستخدام جفنة ومدقة في 10 مل اسيتون 80%، ثم ثقلت بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق حيث فصلت الرشاحة ووضعت في أنبوب جديد وأكمل الحجم إلى 20 مل بالاسيتون السابق، أخذت القراءات باستخدام مطياف ضوئي على طول موجة 663 و 645 نانو متر وحسبت تراكيز اليخضور باستخدام معادلة Arnon الموثقة في (الجواري، 2004):

$$\text{مغ الكلوروفيل/ غ نبات} = (D_{663} * 18.2) + (D_{645} * 20.2) \cdot V * (W * 100)$$

بحيث V: الحجم النهائي للرشاحة، W: الوزن الرطب (غ)

حللت نتائج المجموعتين احصائياً عن طريق اختبار T باستخدام برنامج SPSS17.

### **3-11 تقييم الهاربين في تحريض مقاومة القمح تجاه مسببات مرض تعفن جذور القمح:**

**النبات:** اختير صنف القمح بحوث 5 القابل للإصابة بمرض عفن جذور النبات وفق ما ذكر في (النائب وآخرون، 2002).

**محفز النمو والمقاومة:** استخدم بروتين هاربين المؤشب، بالتركيز الذي لم يسبب فرط حساسية على القمح.

**العزلات الفطرية المدروسة:** تم الحصول على العزلات الفطرية من مخبر المبيدات الفطرية في كلية الزراعة قسم وقاية النبات معرفة مسبقا وهي 3 عزلات تنتمي للأجناس (*Fusarium, Pythium, Rhizoctonia*) حيث جُهِز 3 أطباق بتري، طبق لكل عزلة يحوي هيفات فطرية منماة على وسط مغذي Potato Dextrose Agar (PDA)، وللحصول على مشيجة جديدة أخذت قطعة 8 مم من المشيجة لكل طبق ونقلت إلى طبق جديد يحوي وسط مغذي PDA وحضنت ل 3 أيام على درجة حرارة 25 م° واستخدمت المشيجة الجديدة في الإلحاق.

**3-11-1 التأثير في مقاومة القمح لعفن الجذور:** عقت بذار القمح سطحياً بكحول 70% لمدة 3 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم 3 مرات ثم قسمت البذار لـ 3 مجموعات، نقعت المجموعة الأولى لمدة 24 ساعة في محلول الهاربين بالتركيز 1 غ/ل (المعاملة الأولى) ونقعت مجموعة أخرى بالماء كشاهد أول (معاملة ثانية) أما الأخيرة فبعد نقعها بالماء غمرت 5 د بمعقم البذار دايفنكونازول بالتركيز المنصوح به (7.5 غ / 10 ليتر) (معاملة ثالثة).

وضعت البذور في أطباق تحوي ورق نشاف مرطب ريشما تتببت، ثم زرعت في أصص قطرها 10 سم جهزت مسبقاً؛ حيث وضع بأسفل الأصص طبقة قطن ثم طبقة رمل ثم تربة معقمة بالاتوغلاف لتتلاءم ثلاثي الأصيص، عد كل أصيص (مكرر) وزرع فيه 3 بذور منبئة، وأجريت العدوى بوضع أقراص من الفطر الممرض بقطر 8 مم قرب البذار وتغطيتها بالتربة، حضر لكل عزلة 3 مكررات وبذلك يكون لدينا 27 أصيص [3 عزلات فطرية \* 3 مكررات \* 3 معاملات (هاربين + ماء + معقم)].

أخذت القراءات حتى بعد ظهور الأوراق الثلاثة الأولى

حددت نسبة الإصابة من المعادلة : نسبة الإصابة = عدد النباتات التي ظهر فيها تلون بني بالسلامية تحت التاج / العدد الكلي للنباتات ضمن كل معاملة.

حسبت شدة الإصابة بالمرض باعتماد سلم تقييس ثلاثي (Ledingham وآخرون، 1973) عدم تلون السلامة تحت التاج = 0، تلون بني يغطي ربع السلامة تحت التاج = 1، تلون بني يغطي مساحة أكبر من ربع السلامة تحت التاج = 2 .

حللت التجربة إحصائياً عن طريق اختبار Kruskal-Wallis باستخدام برنامج SPSS17

### 3-12 تقييم فعالية بروتين الهاربين المؤشب في إمرضية بكتيريا التخطط الشفاف على القمح:

**المادة النباتية:** صنف القمح شام 6 وذلك لقابليته للإصابة بمرض التخطط الشفاف على القمح وفق ما ورد في (مندو، 2007).

**المحفز:** بروتين الهاربين المؤشب، استخدم أعلى تركيز لم يؤد لفرط حساسية (التركيز 1 غ / ل).

**العزلات البكتيرية المختبرة:** استخدم في هذه الدراسة عزلتين محليتين معرفتين من بكتيريا *Xanthomonas translucens* (Xt4.2، Xt10)، أخذت من مخبر الأمراض البكتيرية في قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة دمشق. حيث عزلت من عينات قمح مصابة بعد تعقيم الأنسجة النباتية سطحياً بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 3% لمدة ثلاث دقائق، ثم غُسلت بماء مقطر معقم لإزالة آثار هيبوكلوريت الصوديوم 3مرات، ثم طحنت العينات بماء مقطر معقم، وتركت لمدة 30 دقيقة حتى تتحرر البكتيريا من الأنسجة ونشرت على وسط مغذي عام YPGA (Yeast extract 7 g/l, Peptone 7 g/l, Glucose 7 g/l and Agar 1.5 g/l) مضافاً له 50 mg Cycloheximide /لتر كمضاد فطري وحضنت الأطباق على درجة حرارة 28 س لمدة 72 ساعة.

**3-12-1 اختبار القدرة الإمرضية للعزلات:** أجريت عدوى اصطناعية للعزلات البكتيرية التي حصل عليها بحقن معلق بكتيري بتركيز  $10^8$  cfu / مل بطريقة الترشيح باستخدام سيرنج معقم بدون إبرة وذلك ضمن نسيج أوراق بادرات قمح بعمر 15 يوم مزروعة في كؤوس بلاستيكية تحتوي على التورب تحت ظروف حرارة 25-30 م

وإضاءة (16 ضوء/8 ظلام)، غطيت البادرات المحقونة بأكياس نايلون خلال الساعات الأولى من العدوى لتأمين الرطوبة العالية لتطور المرض. وفحصت البادرات يومياً لمدة أسبوع حيث اعتبرت العزلة ممرضة في حال ظهور أعراض التشبع بالماء و/أو الاصفرار على الأوراق مكان وحول منطقة العدوى، وغير ممرضة عند عدم ظهور تلك الأعراض (Duveiller *et al.*, 1997).

نميت كلا العزلتين على وسط مغذي YPGA السابق، وجهاز معلق بكتيري بتركيز  $10^6$  cfu/مل من مستعمرات بعمر 24 ساعة.

**3-12-2 الحد من الشدة المرضية لـ Xt في القمح:** زرعت بذار القمح صنف شام 6 في أصص صغيرة قطر 10 سم مملوئة بالتورب إلى الثلثين تقريباً ومتقبة من الأسفل، وضع في كل أصيص 5 بذار، عوملت البادرات بعمر 20 يوم بطريقة الرش بالهاربين بأعلى تركيز لم يحدث فرط حساسية وبالشاهد الماء المقطر (100 بذرة لكل معاملة)، بعد 48 ساعة رشت أوراق نصف البادرات (100 بادرة) بالمعلق البكتيري للعزلة Xt10 والقسم الثاني بمعلق بكتيري للعزلة Xt4.2، حضر المعلقين بتركيز  $2 \times 10^8$ ، وقيمت شدة الضرر ضمن الأنسجة النباتية بعد ظهور الإصابة بـ 10 أيام، وذلك اعتماداً على المساحة المصابة من الورقة المعدة حسب عن طريق سلم لشدة الإصابة (Duveiller *et al.*, 1994) :

1 = البقعة تغطي 1% من مساحة الورقة

2 = البقعة تغطي 5% من مساحة الورقة

3 = البقعة تغطي 10% من مساحة الورقة

4 = البقعة تغطي 25% من مساحة الورقة

5 = البقعة تغطي 50% من مساحة الورقة

وحُسبت الشدة المرضية لكل من الشاهد والنباتات المُعاملة بالهاربين وفق المعادلة (Wheeler, 1970)

النسبة المئوية لشدة الإصابة = مجموع (عدد النباتات المصابة في كل درجة \* درجة الإصابة) / أعلى درجة إصابة \* عدد النباتات الكلية

حللت النتائج عن طريق إجراء اختبار T لدراسة الفروق المعنوية بين شدة الإصابة البكتيرية في النباتات المعاملة الهاربين والشاهد.

**3-12-3 تقييم النمو البكتيري في الأوراق:** باستخدام طريقة العد البكتيري وفق طريقة ( Marmey *et al.*, 2007) حيث بعد معاملة البادرات ببروتين الهاربين والشاهد الماء، أعدت الأوراق المعاملة بالعزلات البكتيرية بطريقة الترشيح بواسطة محقن بدون إبرة ومن ثم أخذت وعلى مدار أسبوع وبواسطة مسبر معدني 3 أقراص من القمح المعدني بقطر 0.5 سم وكل قرص طحن في 1 مل ماء مقطر معقم وأخذنا عدة تمديدات  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$  وأخذ من كل تمديد 10 ميكروليتر وزرعت على طبق بيتري حاوي وسط مغذي عام YPGA وحضن 72 ساعة وأخذت القراءات، ومن ثم حسبت تراكيز البكتيريا ضمن النسج الملقحة بالبكتيريا المعاملة بالهاربين والشاهد وأخذ اللوغاريتم العشري لها. حللت النتائج عن طريق إجراء اختبار T لدراسة الفروق المعنوية بين التعداد البكتيري في النباتات المعاملة الهاربين والشاهد.

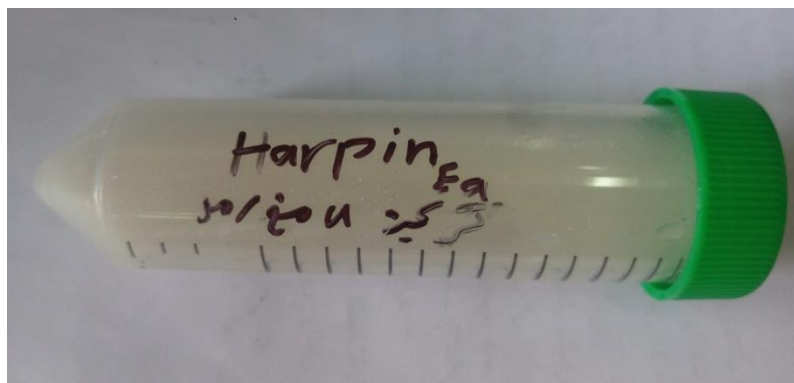
## الفصل الرابع

### النتائج و المناقشة

### Results and Discussion

#### 4- النتائج والمناقشة:

**4-1 تنسيل المورثة *HrpN* وتعبير البروتين :** أجري العمل كاملا كما أسلف سابقا في هيئة الطاقة الذرية بدمشق بإشراف الدكتور أنطونيوس الداود، وتم الحصول على بروتين الهاربين المؤشب النقي الشكل (8)، أظهرت نتائج قياس التركيز باستخدام طريقة برادفورد أن تركيز البروتين المتحصل عليه كان 4 غ /ليتر.

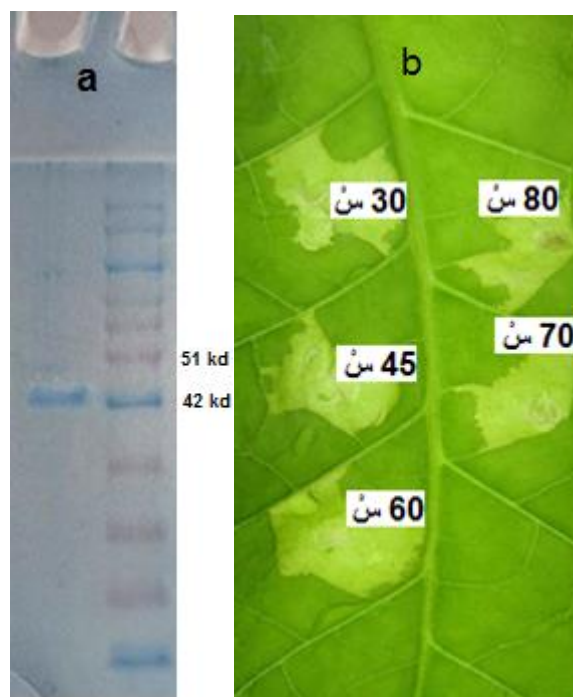


الشكل (8) بروتين الهاربين المؤشب Harpin بعد التنقية

#### 4-2 دراسة خصائص الهاربين المنتج:

**قياس وزن البروتين الجزيئي:** حضرت الهلامية وأجري رحلان SDS-PAGE ولونت الهلامية، أظهرت النتائج وجود حزمة واضحة وحيدة دلالة على نقاوة البروتين الشكل (9a)، وكانت الحزمة أعلى قليلا من حزمة الـ 42 كيلو دالتون وأخفض من حزمة الـ 51 كيلو دالتون في مؤشر الأوزان البروتينية المستخدم وتقديريا كانت حوالي 44 كيلو دالتون وهذه النتيجة موافقة لما أورده ( Wei *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 2013 ) بأن وزن الهاربين المنتج من *Erwinia Amylovora* 44 كيلو دالتون.

**اختبار الثباتية الحرارية:** أدى حقن بروتين الهاربين المؤشب المنقى بعد تعريضه لدرجات حرارة مختلفة (30، 45، 60، 70، 80 س) لفطر حساسية على التبغ الشكل (9b)، مما يدل على ثباتية حرارية جيدة وذلك موافق لخاصية الثبات الحراري لبروتين الهاربين كما أشار (Wei *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 2013).



الشكل (9): a رحلان SDS-PAGE لبروتين الهاربين المدروس بالمقارنة مع معلم وزن جزيئي ملون، b فرط

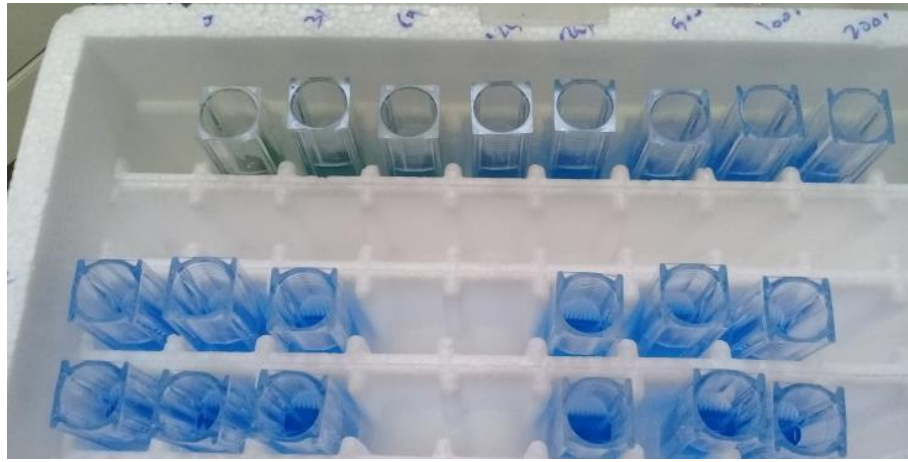
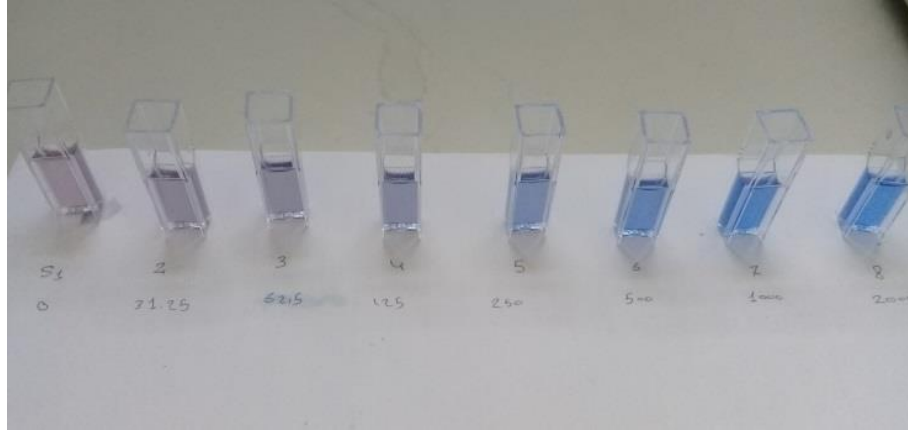
الحساسية على التبغ بعد الحقن ببروتين الهاربين المعرض لدرجات حرارة مختلفة

#### 3-4 تقييم كفاءة بروتين الهاربين المؤشب في تحريض أنزيم الـ SOD في القمح:

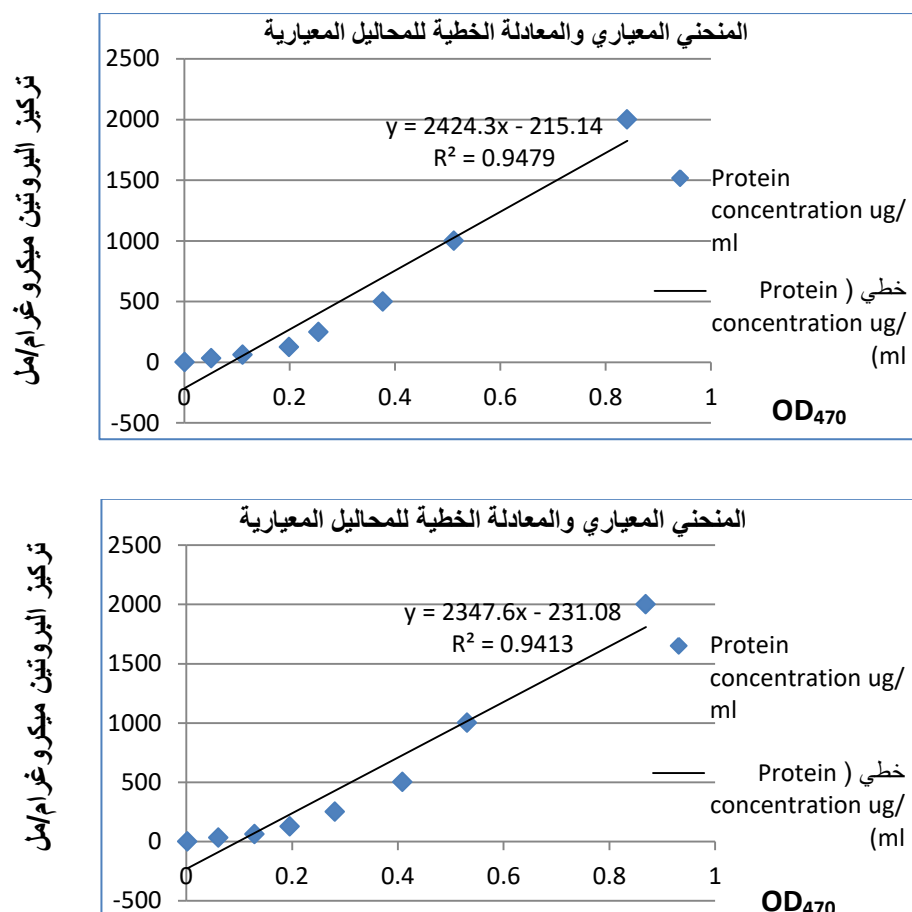
##### 1-3-4 استخلاص البروتينات الكلية وقياس تركيزها:

عزلت البروتينات الكلية من العينات المعاملة بالهاربين والعينات المعاملة بالماء وقيست تراكيزها بطريقة Bradford (1976) اعتماداً على المحاليل المعيارية من الـ BSA الشكل (10)، حيث رسمت المنحنيات المعيارية للمحاليل المعيارية المدروسة لكل زمن حصاد على حدة، وحُصل على المنحنيات المعيارية والمعادلات الخطية الشكل (11)، والتي عن طريقها حددت تراكيز البروتين الكلية لعينات كل زمن حصاد بعد تعويض قراءة الامتصاصية لها في معادلة المنحنى المعياري المرسوم لهذا الزمن الجدول (10).

مع التنويه أن دراسة فعالية الأنزيمية للأنزيم السوبروكسيد دسموتاز SOD، وأنزيم البيروكسيداز POD في هذه الخلاصات البروتينية الطازجة أجريت مباشرة.



الشكل (10): تفاعل محلول برادفورد مع محاليل قياسية من ألبومين المصل البقري BSA المحضرة بعدة تراكيز (في الأعلى) ويلاحظ التدرج اللوني الحاصل، تفاعل محلول برادفورد مع البروتين الكلي المعزول من عينات زمن حصاد 48 سا بعد المعاملة (في الأسفل)



الشكل (11): المنحني المعياري المرسوم والمعادلة الخطية للمحاليل المعيارية المدروسة لبعض الأزمنة المدروسة، زمن

حصاد 48 سا بعد الرش (في الأعلى)، وزمن حصاد 72 سا بعد الرش (في الأسفل)

الجدول (10) متوسط تراكيز البروتين (ميكروغرام/مل) في العينات المدروسة في معاملة الهاربين ومعاملة الشاهد لكافة

أزمنة الحصاد

| المعاملة / زمن الحصاد | 0 سا     | 1 سا     | 2 سا     | 4 سا     | 18 سا    | 24 سا    | 48 سا    | 72 سا    | 96 سا    |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| control treatment     | 1014.464 | 1157.69  | 1239.625 | 1387.338 | 1355.97  | 1298.41  | 1457.885 | 1464.9   | 1357.071 |
|                       | 1137.884 | 1078.634 | 1257.603 | 1421.111 | 1282.287 | 1257.62  | 1498.84  | 1409.141 | 1338.291 |
|                       | 1029.275 | 1081.226 | 1251.182 | 1427.365 | 1346.238 | 1195.545 | 1458.839 | 1369.14  | 1263.167 |
| H arpin treatment     | 636.799  | 1282.106 | 1284.57  | 1429.867 | 1189.14  | 1301.874 | 1513.386 | 1453.991 | 1303.077 |
|                       | 696.406  | 1157.69  | 1216.51  | 1429.867 | 1222.506 | 1274.295 | 1475.809 | 1437.02  | 1278.427 |
|                       | 696.406  | 1156.394 | 1323.095 | 1383.586 | 1349.019 | 1341.18  | 1510.962 | 1394.595 | 1297.208 |

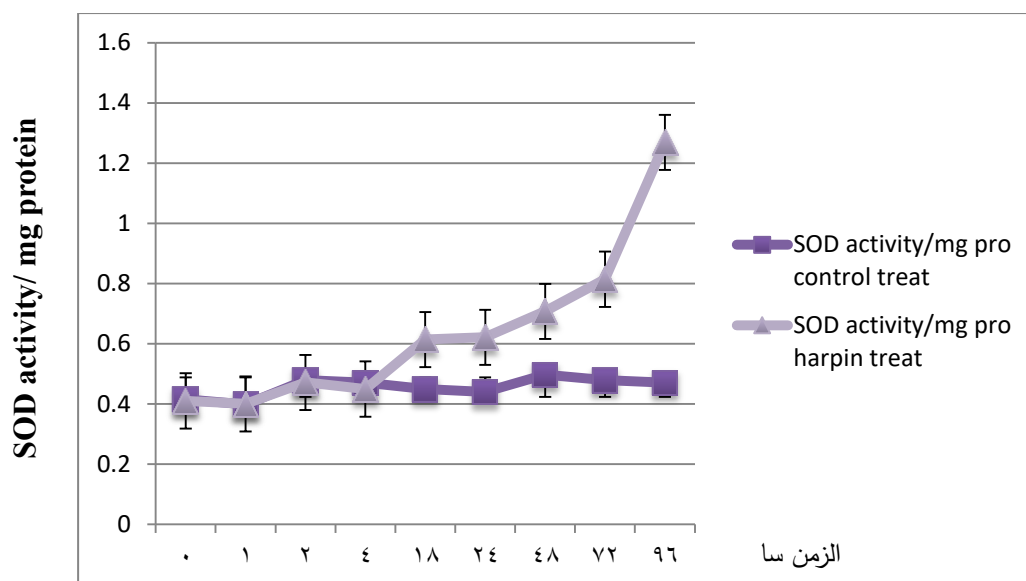
**4-3-2 قياس الفعالية أنزيم الـ SOD اعتماداً على المطياف الضوئي:** أجريت التفاعلات في الأنابيب الزجاجية كما ذكر آنفاً وظهر اللون المميز للفورمازان الشكل (12)، ومن ثم نقل ناتج التفاعل لخلايا بلاستيك لنقرأ بالمطياف الضوئي على طول موجة 560 نانومتر.



الشكل (12) تدرج في التفاعل اللوني الحاصل من تفاعل الـ NBT مع انيون سوبركسيد نتيجة منافسة انزيم الـ SOD لـ

NBT

عند قياس فعالية الأنزيم باستخدام المطياف الضوئي أظهرت النتائج زيادة في فعالية أنزيم السوبركسيد دسموتاز في الأنسجة النباتية لأوراق القمح المعاملة رشاً ببروتين الهاربين المحلي مقارنة بالمعاملة بالماء المقطر، وبدأت الزيادة الملحوظة في فعالية الأنزيم من الساعة الـ 18 بعد الرش؛ حيث بلغت في العينات المعاملة بالهاربين 0.614 نسبة إرجاع NBT/دقيقة/ 1مغ بروتين، مقارنة بفعالية قدرها 0.449 نسبة إرجاع NBT/دقيقة/ 1مغ بروتين للعينات المعاملة بالماء، وتزايدت الفعالية معنوياً حتى بلغت أعلى تركيز للأنزيم بعد 96 ساعة من الرش حيث وصلت إلى 1.26 نسبة إرجاع NBT/دقيقة/ 1مغ بروتين، مقارنة مع الشاهد الذي بلغ 0.47 نسبة إرجاع NBT/دقيقة/ 1مغ بروتين الشكل (13)، وأظهر التحليل الإحصائي أن هذه الفروقات بين معاملة الهاربين والشاهد من الزمن 18 بعد الحصاد إلى الزمن 96 سا بعد الحصاد كانت معنوية، وكانت فعالية السوبركسيد دسموتاز بالزمن 96 ساعة بعد المعاملة بالهاربين هي الأفضل معنوياً.



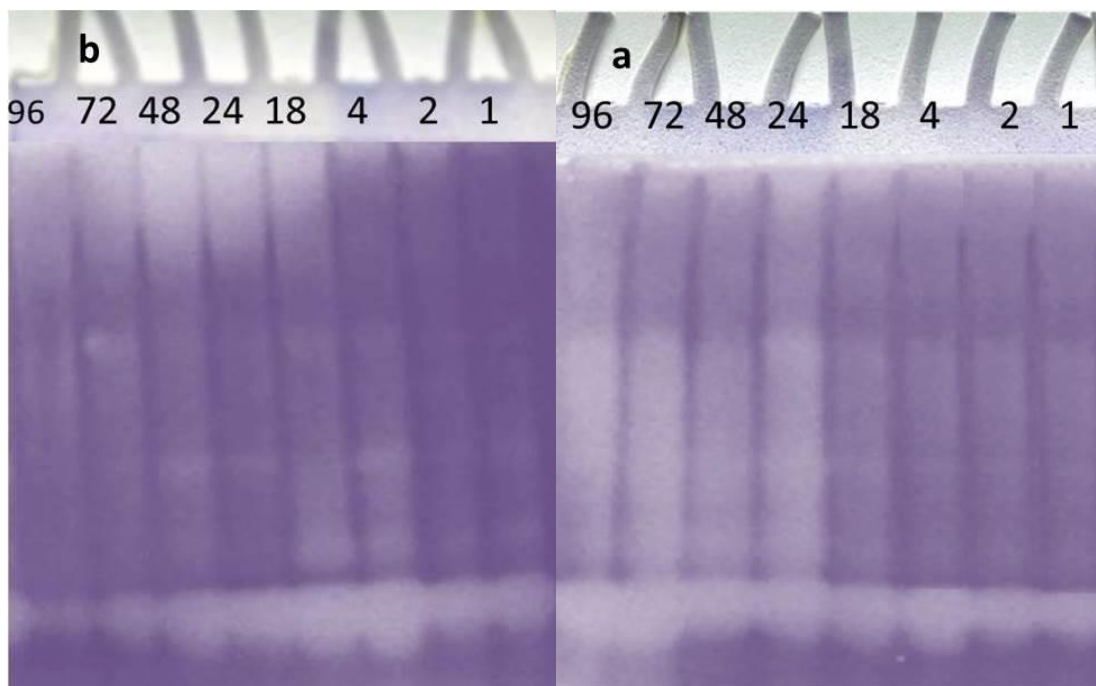
الشكل (13) مخطط قياس فعالية أنزيم الـ SOD مع الزمن في بادرات القمح المعاملة رشاً ببروتين الهاربين مقارنةً بالمعاملة بالشاهد (الماء)

وبذلك يكون لمعاملة النبات بالهاربين أثر واضح في زيادة فعالية أنزيم السوبركسيد ديسموتاز أحد أهم أنزيمات الردود الفعل الدفاعية عند النبات وهذا موافق لما بينه ( Zhang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020; Binici *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2023) بتحريض بروتين الهاربين لفعالية أنزيم الـ SOD في عدة أنواع نباتية كالرز والصويا وغيرها، مع الأخذ بعين الاعتبار أنه لم يؤخذ عينات لزمن بعد 96 ساعة من الرش ولذلك يمكن أن تزيد الفعالية لأنزيم الـ SOD وأيضاً يمكن أن تتخفض فعاليته بعد الـ 96 ساعة كما ظهر مع ( Wang *et al.*, 2020) في نبات *Pinellia ternata*.

#### 4-3-3 قياس فعالية أنزيم الـ SOD باستخدام الرحلان الكهربائي Native-PAGE :

أجريت تجربة Native-PAGE للخلاصات البروتينية المحفوظة بالتجميد مع الغليسيرول والعائدة لأزمة الجمع المختلفة، ظهر في الهلامة المعاملة بالـ NBT وجود عدة حزم شفافة في كل عينة هذه الحزم عائدة لأنزيمات الـ SOD المختلفة، وكانت النتائج مؤكدة لما ظهر في دراسة الفعالية باستخدام المطياف الضوئي، حيث كانت كثافة الحزم الشفافة في العينات المعاملة ببروتين الهاربين خلال الـ 4 ساعات الأولى مقارنة لكثافة الحزم الشفافة في

العينات المعاملة بالشاهد الماء، بينما ازدادت كثافة هذه الحزم في العينات المعاملة بالهاربين لأزمنة الحصاد من 18 ساعة لـ 96 ساعة بعد الرش وذلك لحزم الـ SOD المختلفة، مقارنة بالعينات المعاملة بالماء لهذه الأزمنة والتي بقيت كثافتها على نفس الدرجة تقريبا الشكل (14)، أي أن فعالية أنزيمات الـ SOD ازدادت بشكل عام عند المعاملة ببيروتين الهاربين.



الشكل (14) الرحلان الكهربائي لهلامة متعدد الأكريل أميد a: الخلاصات البروتينية للعينات المعاملة بالهاربين لأزمنة الحصاد 0 إلى 96 ساعة b: الخلاصات البروتينية للعينات المعاملة بالماء لأزمنة الحصاد من 0 إلى 96 ساعة

لوحظ بعد التوقف عن ري الأصص بعد الحصاد الأخير (96 ساعة بعد الرش) وبقاء الأصص في مكانها لمدة أسبوع، تحمل الأصص المعاملة ببيروتين الهاربين للعطش حيث بقيت البادرات خضراء مقارنة بالأصص المعاملة بالماء والتي ذبلت واصفرت بادراتها الشكل (15)، ويمكن أن نعزي السبب إلى ازدياد فعالية أنزيم الـ SOD حيث ذكرت العديد من المراجع بأن أنزيم الـ SOD له دور مباشر في مقاومة الإجهادات اللاإحيائية وهو خط الدفاع الأول بشكل خاص في مواجهة الإجهاد المائي (Manavalan and Nguyen, 2017; Dudziak *et al.*, 2019)، حيث يحول يحول الأشكال الفعالة للأكسجين ROS إلى بيروكسيد الهيدروجين السام للخلايا والذي يزال لاحقاً عن طريق انزيمات أخرى تزداد فعاليتها بعد المعاملة بالهاربين مثل الغلوتاثيون بيروكسيداز أو

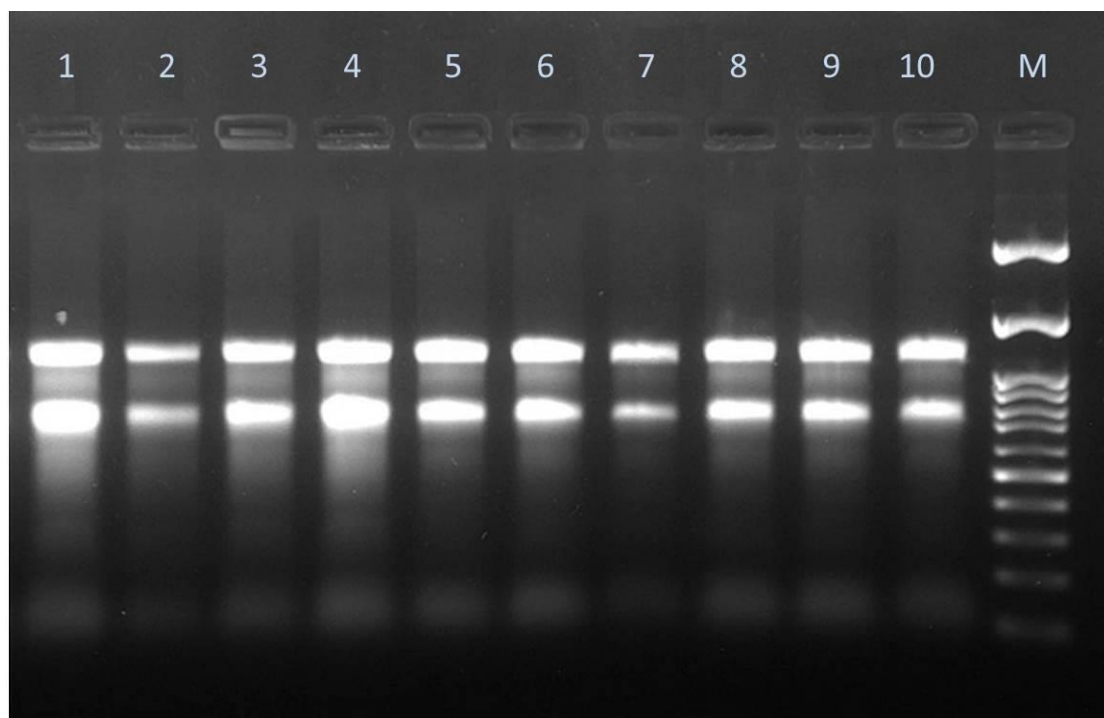
الكاتلاز، حيث تفككه إلى أوكسجين وماء يساعد على تحمل هذا الإجهاد المائي (Leonowicz *et al.*, 2018; )  
(Maurya and Namdeo, 2022).



الشكل (15) نباتات القمح المتروكة بدون سقاية لمدة أسبوع بعد حصاد العينات لجميع الأزمنة، على اليمين النباتات المعاملة بالهاربين وعلى اليسار النباتات المعاملة بالماء

#### 4-3-4 دراسة التعبير المورثي للمورثة SOD:

عزل الحمض النووي الريبي RNA من العينات المحفوظة في الـ 70- للعينات المعاملة بالهاربين والعينات المعاملة بالماء لأزمنة 0، 24، 48، 72، 96 ساعة، رحلت الأحماض النووية المعزولة على هلامه آغاروز 1% للتأكد من سلامة الحمض النووي المعزول وأظهرت نتيجة الرحلان وجود حزمتين واضحتين في العينات، وهي حزمة 28S وحزمة 18S الشكل (16) جميع الحزم الناتجة غير مفككة أي أن الـ RNA المعزول سليم.



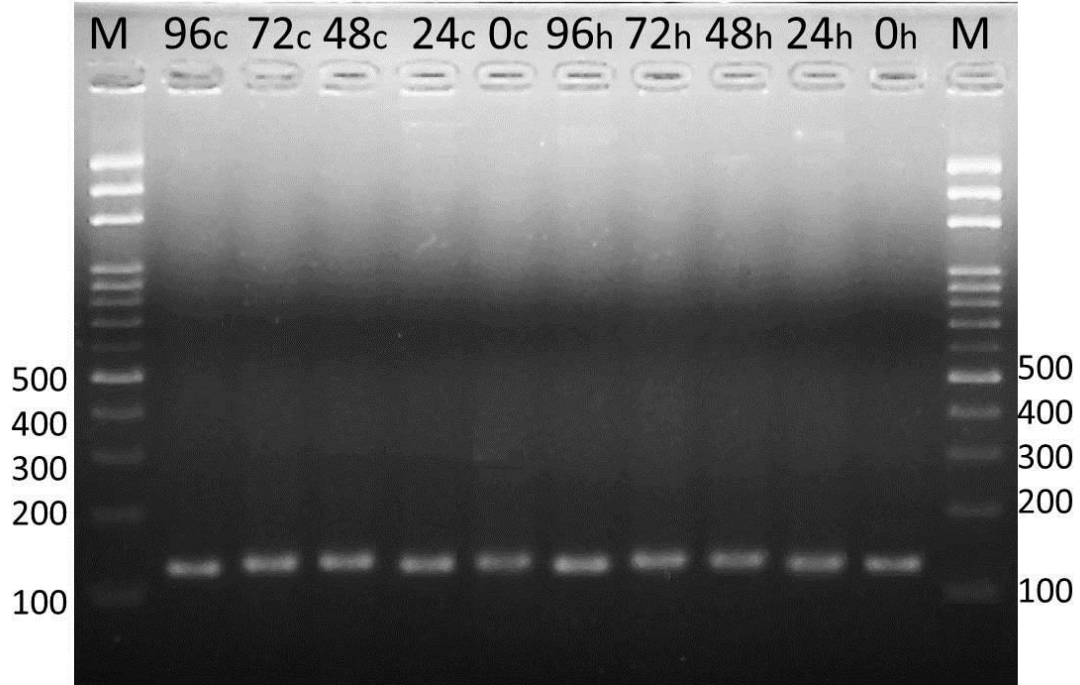
الشكل (16) رحلان عينات الـ RNA المعزولة من عينات القمح المعاملة بالهاربين (1-5) والعينات المعاملة بالشاهد

الماء (6-10) على هلامه آغاروز 1% وذلك مقارنة بمعلم وزن جزيئي 100 bp (M).

بعد التأكد من سلامة الـ RNA أجري التفاعل للحصول على الـ cDNA وحسبت التراكيز بالاعتماد على قياس الامتصاصية على طول موجة 260 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي، ووحدت التراكيز ومن ثم أجري تفاعل الـ PCR لمورثتي الـ zn-SOD ولمورثة الأكتين كشاهد دائم التعبير عن نفسه، أظهرت النتائج الشكل (17) حزم بطول 138 bp تقريبا عند المقارنة بمعلم الوزن الجزيئي عند التضخيم باستخدام البادئات الخاصة بالاكيتين وهو الطول المتوقع لهذه القطعة، مما يدل على نجاح إنشاء cDNA من الـ RNA للعينات.

امتازت حزم الأكتين بالكثافة الضوئية المتماثلة بشكل تقريبي فيما بينها، أما عند إجراء التضخيم لمنطقة الـ zn-SOD ظهرت حزم بوزن تقريبي 101 bp لكن اختلفت كثافتها حسب العينة حيث بقيت كما هي تقريباً في العينات المعزولة من نباتات القمح المرشوشة بالماء بينما في العينات المرشوشة بالهاربين تزايدت الكثافة تدريجياً من زمن الحصاد 0 إلى 24 ساعة ثم 48 أي أن التعبير المورثي قد زاد، وكانت أعلى كثافة حزمة عند زمن

حصاد 96 ساعة بعد المعاملة بالهاربين مقارنة بالشاهد المعامل بالماء مما يؤكد لنا أن نسخ مورثة السوبركسيد تزايد تدريجياً بعد رش أوراق القمح بالهاربين الشكل (18).



الشكل (17) نتائج رحلان نواتج الـ PCR لعينات الـ cDNA العائدة للقمح المعامل بالهاربين (h) والشاهد (c) لأزمنة الحصاد المختلفة والمضخمة ببيادئات الأكتين



الشكل (18): نتائج رحلان نواتج الـ PCR لعينات الـ cDNA العائدة للقمح المعامل بالهاربين (h) والعينات المعاملة بالماء (c) لأزمنة الحصاد (96-72-48-24-0) ساعة والمضخمة بالبيادئات المتخصصة بالـ SOD مقارنة مع معلم وزن جزيئي 100 bp

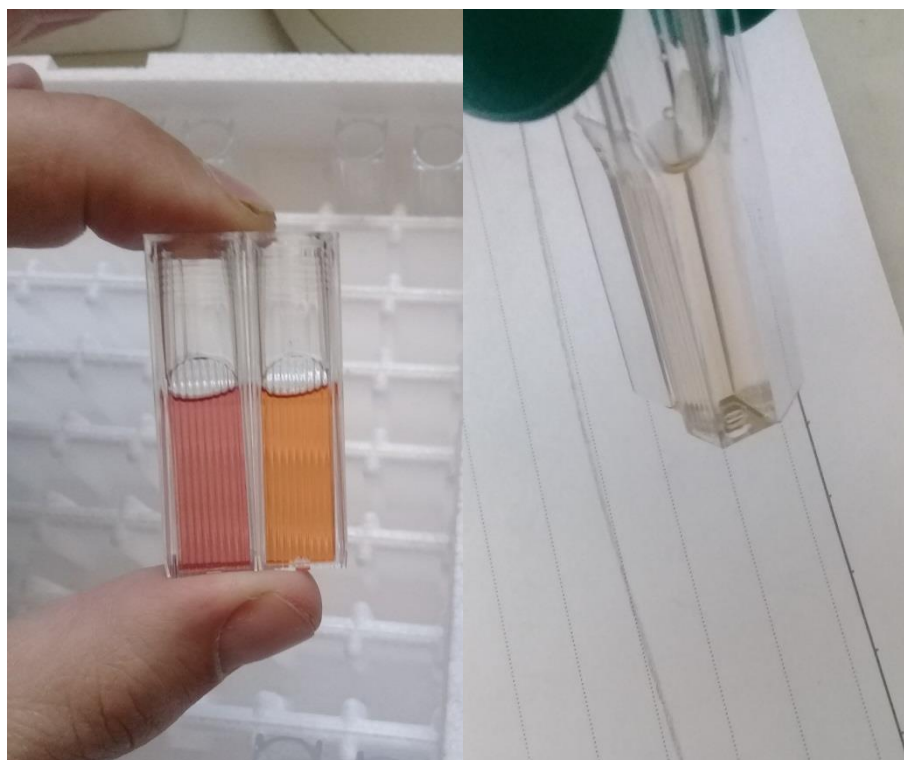
وبذلك تكون نتائج التعبير المورثي موافقة لنتائج الفعالية الأنزيمية مما يدل على تأثير بروتين الهاربين بتحريض انتاج أنزيم الـ SOD على مستوى النسخ أي أنه أدى لزيادة التعبير عن المورثة المسؤولة عن أنزيم الـ SOD. تبين في هذه الدراسة أن الفعالية الأنزيمية للـ SOD لم تظهر خلال الساعات الأربع الأولى من الرش بالهاربين إنما ظهرت بعد 18 ساعة فقط من المعاملة وكانت قريبة من قيمتها لزمن 24 سا بعد المعاملة ولهذا كانت دراسة التعبير المورثي من الزمن 24 ساعة بعد المعاملة مع وجود الزمن 0 (الحصاد بعد الرش مباشرة قبل حصول أي تأثير).

ازدياد الفعالية الأنزيمية لأنزيم الـ SOD في بادرات القمح المعامل بالهاربين مقارنة بالمعاملة بالماء وتحملها للعطش بعد ذلك يدل أن هذا الأنزيم يلعب دوراً في تنظيم وتخفيض مستويات الأشكال الفعالة للأوكسجين ROS في النبات وهذا موافق لما أشار إليه (Leonowicz *et al.*, 2018; Maurya and Namdeo, 2022) لآلية عمل أنزيم الـ SOD حيث يحول الجذور الحرة للأوكسجين السامة للخلايا إلى بيروكسيد الهيدروجين والذي يتفكك لاحقاً إلى ماء وأوكسجين عن طريق انزيمات أخرى مثل الغلوتاثيون بيروكسيداز أو الكاتالاز وبالتالي في العلاقة ما بين الممرض والنبات يعد أنزيم الـ SOD يعد أول خط دفاعي ضد الأشكال الفعالة للأوكسجين ROS. الارتفاع الحاصل في مستويات أنزيم الـ SOD في بادرات القمح بعد معاملتها رشاً ببروتين الهاربين يسمح في تنظيم مستويات الـ ROS وبالتالي تحمل الاجهادات الحيوية وغير الحيوية في نبات القمح.

#### 4-4 دراسة كفاءة الهاربين المؤشب في تحريض فعالية أنزيم البيروكسيداز (POD) Peroxidase

##### في القمح:

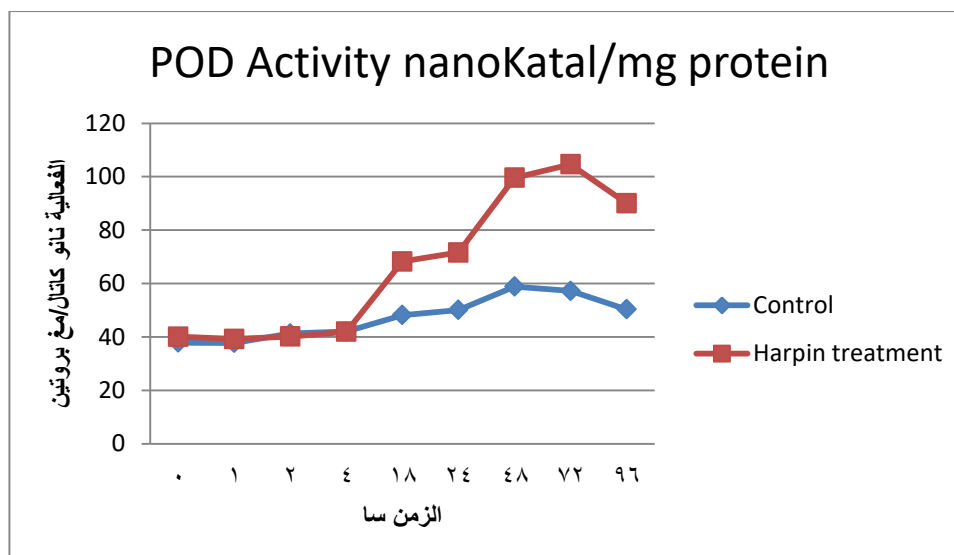
4-4-1 قياس فعالية أنزيم POD اعتماداً على المطياف الضوئي: أجريت التفاعلات للخلاصات البروتينية الطازجة، واستخدمت خلايا مطياف ضوئي بلاستيك، أخذت القراءات بالمطياف الضوئي على طول موجة 470 نانومتر لمدة 2 د كما ذكر آنفاً وظهر اللون المميز للتيتراغاياكول البرتقالي وزادت شدة اللون مع الزمن مع الشكل (19).



الشكل (19): تدرج في التفاعل اللوني الحاصل من تفاعل الغاياكول guaiacol مع بيروكسيد الهيدروجين بوجود البيروكسيداز منتجاً التيتراغاياكول tetra guaiacol

وأظهرت النتائج زيادة في فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأنسجة النباتية لأوراق القمح المعاملة رشاً ببروتين الهاربين المحلي مقارنة بالمعاملة بالماء المقطر، حيث بدأت الزيادة من بعد الساعة الـ 4 من الرش وتزايدت حتى بلغت أعلى تركيز للأنزيم بعد 72 ساعة بعد معاملة الرش حيث وصلت إلى 104.62 نانوكاتال/مغ، مقارنة مع الشاهد الذي بلغ 57.21 نانوكاتال/مغ، ثم انخفض التركيز في الزمن 96 ساعة بعد معاملة الرش بالهاربين إلى 90.05 نانوكاتال/مغ مقابل 50.31 نانوكاتال/مغ في الشاهد الشكل (20).

وبين التحليل الإحصائي أن جميع الفروق بين معاملة الهاربين والشاهد في فعالية البيروكسيداز لدهما في الأزمنة 18 إلى الزمن 96 ساعة بعد الحصاد كانت معنوية.



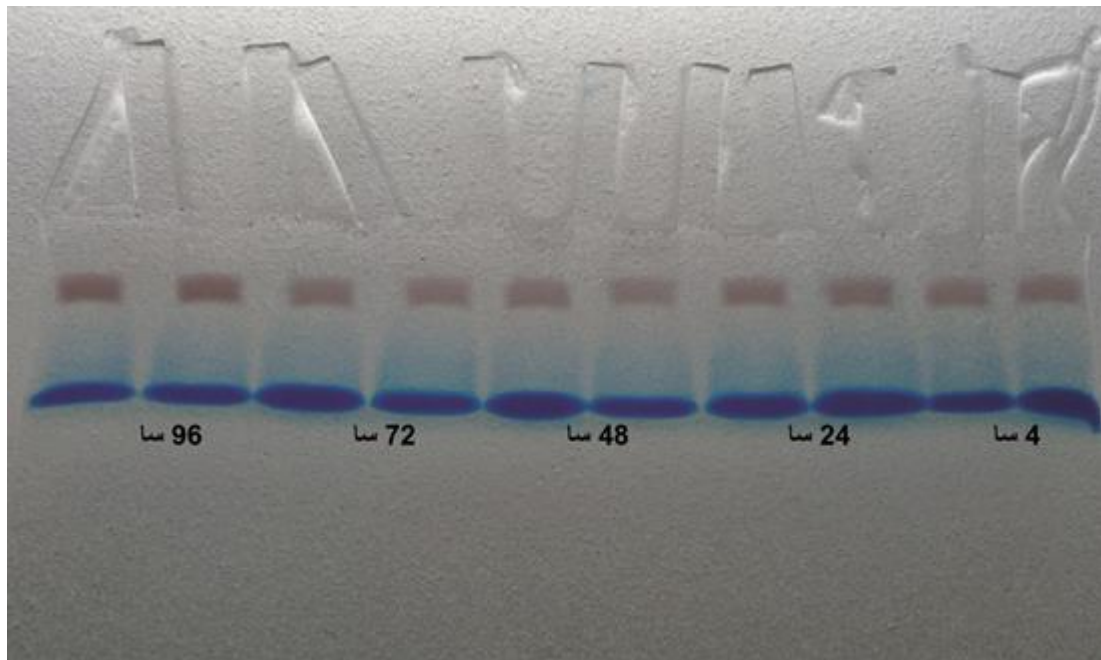
الشكل (20) مخطط قياس فعالية أنزيم الـ POD مع الزمن في بادرات القمح المعاملة بالهاربين مقارنةً بالمعاملة بالشاهد (الماء)

وبذلك يكون لرش بادرات القمح بالهاربين أثر واضح في زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز وهذا موافق لما ذكر من قبل بعض الباحثين، حيث أدى ذلك إلى زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز عند معاملة النبات بالهاربين مثل العناب (Li وزملاؤه، 2012) و *Pinellia ternata* (Wang *et al.*, 2020) والفسق (Binici *et al.*, 2022).

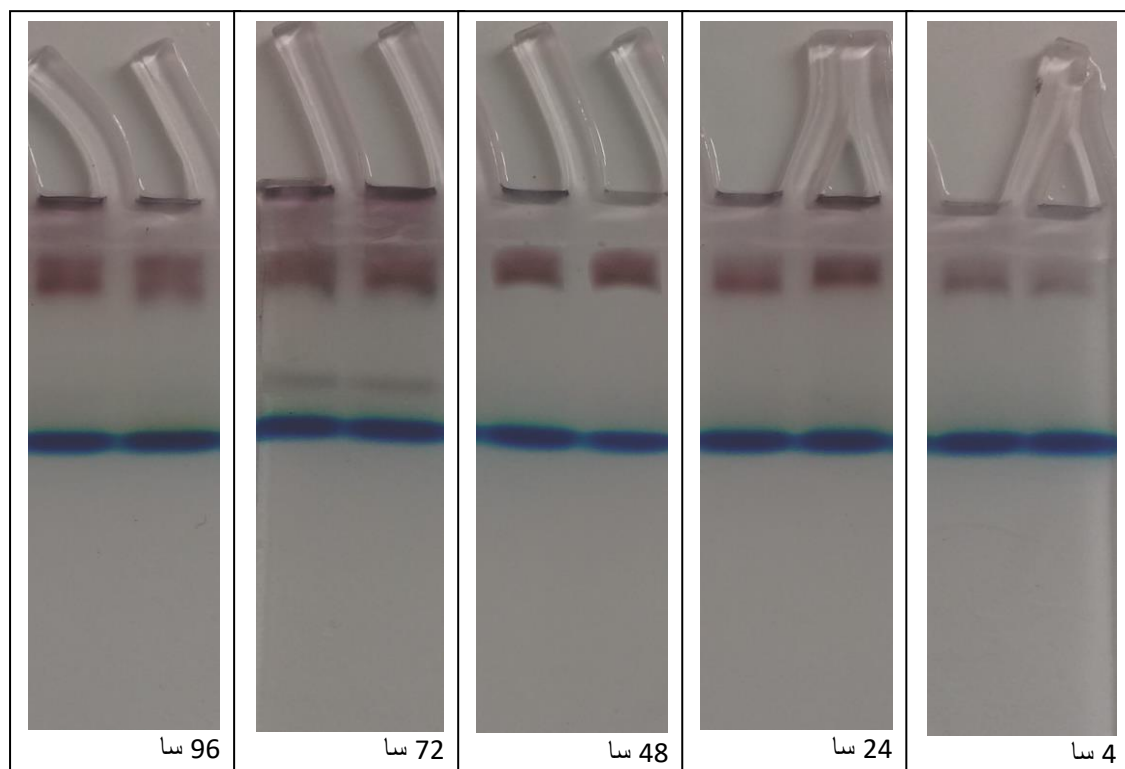
وبالتالي رفع مقاومة القمح تجاه الممرضات كون البيروكسيداز أحد أهم أنزيمات الردود الفعل الدفاعية عند النبات ويزيد اللغنة والنقل وإنتاج الفيتو ألكسينات، إضافة لدوره في حماية النبات من تأثير الأشكال الفعالة للأوكسجين الـ ROS التي تظهر عند حدوث الإجهادات الحيوية واللاحيوية (Almagro *et al.*, 2009: Chakraborty and Pradhan, 2012).

**4-4-2 قياس فعالية أنزيم الـ POD باستخدام الرحلان الكهربائي Native-PAGE :** أكد الكشف عن فعالية أنزيم POD عن طريق إجراء رحلان كهربائي متعدد الأكريل أميد (Native-PAGE) للخلاصات البروتينية المحفوظة بالتجميد للعينات النباتية المدروسة نتائج المطياف الضوئي، فقد بينت صورة الرحلان الثبات النسبي لفعالية الأنزيم عند جميع أزمنة الحصاد ما بعد معاملة الرش بالشاهد (الماء)، فكانت كثافة الحزم وشدة التلون متقاربة نسبياً الشكل (21) على عكس ما ظهر في عينات الحصاد ما بعد الرش بالهاربين، حيث ازدادت كثافة

الحزم وشدتها تدريجياً أي أن فعالية البيروكسيداز تزايدت تدريجياً حتى وصلت لأعلى فعالية (أعلى كثافة وشدة للحزمة الناتجة) في الزمن 72 ساعة بعد الرش ثم انخفضت كثافة الحزمة قليلاً في زمن الحصاد 96 سا بعد المعاملة الشكل (22)، ظهرت في العينات عدة حزم متقاربة بشكل كبير وهي عبارة عن الايزو أنزيمات للبيروكسيداز وأعيدت التجربة عدة مرات لكن لم نتمكن من تقدير عدد الحزم بسبب بطء الرحلان الشديد، فقط عينات الزمن 72 سا بعد المعاملة لوحظت فيها حزمة منفصلة بشكل واضح عن الحزمة الأساسية.



الشكل (21) فعالية الـ POD على هلامة native-PAGE للعينات المعاملة بالماء للأزمنة المختلفة بعد المعاملة

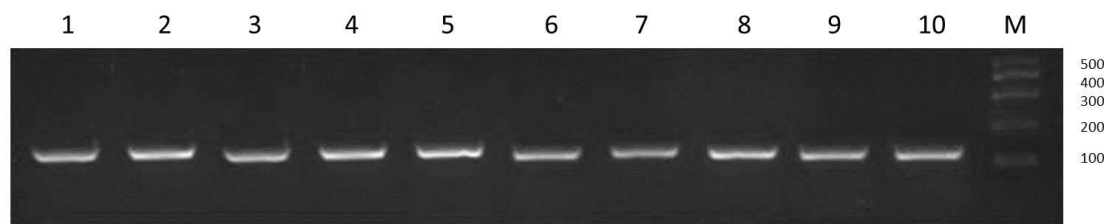


الشكل (22) فعالية الـ POD على هلامية native-PAGE للعينات المعاملة بالهاربين للأزمنة المختلفة بعد المعاملة

#### 4-4-3 دراسة التعبير المورثي لمورثة *GPX* إحدى المورثات المسؤولة عن أنزيم البيروكسيداز :

استخدم الـ cDNA الذي أنشئ من عينات الـ RNA المعزولة من عينات القمح المعاملة بالهاربين والعينات المعاملة بالشاهد الماء الشكل (16)، أجري تفاعل الـ PCR لمورثي الـ *GPX* وقورنت بالتعبير المورثي لمورثة الأكتين كشاهد دائم التعبير عن نفسه الشكل (17)، والذي امتاز بالكثافة الضوئية المتماثلة بشكل تقريبي للحزم الناتجة عند جميع أزمنة الحصاد بعد المعاملة.

كذلك عند إجراء التضخيم لمورثة *GPX*، ظهرت حزم بوزن تقريبي 101 bp وهو الوزن المتوقع للحزمة وبنيت نتيجة الرحلان ثابتية نسبية في التعبير، حيث بقيت كثافة الحزم لجميع العينات كما هي تقريباً سواء في بادرات القمح المعاملة رشاً بالماء أو البادرات المعاملة رشاً ببروتين الهاربين الشكل (23)، أي لم يظهر تأثير لمعاملة القمح ببروتين الهاربين على التعبير المورثي لهذه المورثة.



الشكل (23) نتائج رحلان نواتج ال PCR لعينات ال cDNA العائدة للقمح المعامل بالهاربين (1-5) والشاهد (6-10) لأزمة الحصاد المختلفة و المضخمة ببادئات GPX.

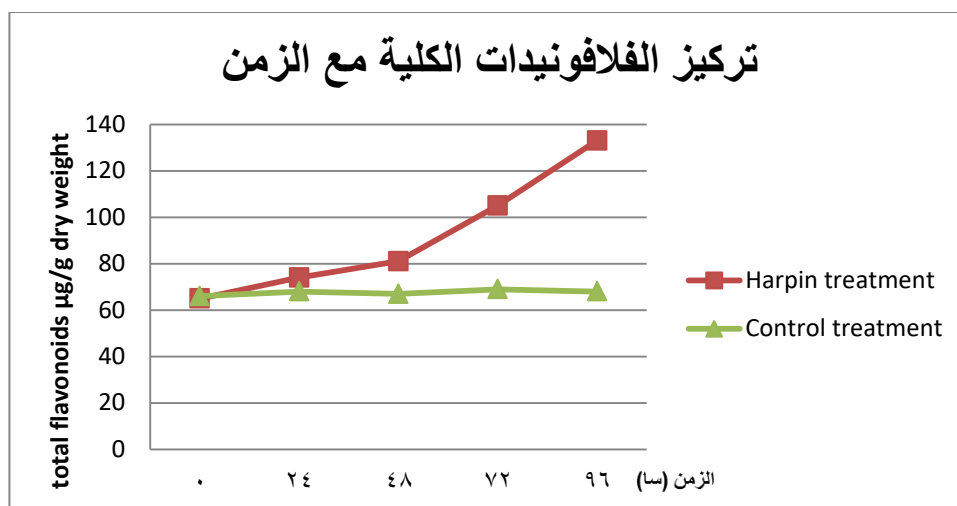
وبذلك تكون نتائج التعبير المورثي للـ GPX غير مرتبطة بنتائج الفعالية الأنزيمية، يمكن أن يفسر عدم الارتباط في العينات المدروسة بوجود عائلة كبيرة من المورثات تشفر هذا أنزيم البيروكسيداز ( Welinder *et al.*, 2004; Passardi *et al.*, 2002) والمورثة التي درست ليست من المورثات التي زاد تعبيرها، وقد يُعزى سبب عدم الارتباط أن زيادة النشاط الأنزيمي لبعض الأنزيمات عائلة لوجود تغيرات وتفاعلات في المرحلة ما بعد النسخ ( Miyamoto *et al.*, 2001; Gen *et al.*, 2001).

تبين لدينا في هذه الدراسة أن معاملة بادرات القمح ببروتين الهاربين أدت لزيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز الذي يعد أحد أهم ردود الفعل الدفاعية ومؤشرات المقاومة لدى النبات، لكن هذه الفعالية لم ترتبط بزيادة في التعبير المورثي لمورثة GPX إحدى مورثات أنزيم البيروكسيداز للأسباب التي ذكرت، وهذا لا يمنعنا أن ننصح باستخدام رش الهاربين المنتج محلياً على نبات القمح من أجل زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز وبالتالي لرفع مقاومته للآفات المختلفة.

#### 4-5 تقدير الفلافونيدات الكلية:

أظهرت نتائج تقدير الفلافونيدات الكلية لعينات القمح المعاملة ببروتين الهاربين مقارنة بالشاهد باستخدام المطياف الضوئي، وجود تأثير لبروتين الهاربين على تراكيز الفلافونيدات الكلية؛ فبينما تركيز الفلافونيدات الكلية لدى العينات المعاملة بالشاهد تراوح ما بين 66 µg / غرام مادة جافة في زمن حصاد 0 سا بعد المعاملة إلى 69 µg / غرام مادة جافة في الزمن 72 سا بعد المعاملة ولم يزد عن ذلك، بينما ازداد التركيز تدريجياً عند المعاملة بالهاربين تدريجياً من 65 µg / غرام مادة جافة في الزمن 0 بعد المعاملة مباشرةً إلى 133 µg / غرام مادة

جافة عند الزمن 96 سا بعد المعاملة؛ أي ازداد التركيز إلى الضعف تقريباً الشكل (24)، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين تراكيز الفلافونيدات بين معاملة الهاربين والشاهد في الأزمنة التي تلت الزمن 0 أي من الزمن 24 إلى الزمن 96 سا بعد الحصاد، وكان التركيز في الزمن 96 سا بعد الحصاد هو الأعلى معنوياً من بقية تراكيز الأزمنة الأخرى.



الشكل (24) تراكيز الفلافونيدات الكلية في أوراق القمح صنف شام 3 المعاملة رشاً بالهاربين مقارنة بالشاهد لأزمنة الحصاد المختلفة بعد المعاملة.

ارتفاع تراكيز الفلافونيدات بعد معاملة القمح ببروتين الهاربين يدل على ارتفاع مقاومته للأمراض؛ إضافة لكون الفلافونيدات تعمل كمضاد للأكسدة أي تقلل من تأثير الجذور الحرة الضارة بالنبات، فإنها أيضاً تعمل كمضادات ميكروبية (فيتوأكسينات phytoalexins)، وبالتالي زيادة تراكيزها ضمن النبات يؤدي لتقليل آثار الممرضات عليه (Ahuja *et al.*, 2012).

**4-6 تأثير بروتين الهاربين في إنبات القمح ونموه:** أظهرت النتائج أن الهاربين لم يؤثر في نسبة الإنبات مقارنةً مع الشاهد، حيث كانت الفروق غير معنوية  $p\text{-value} = 0.66$ ، عند قيمة  $T = 0.447$ .

**4-6-1 التأثير في قوة النمو:** بينت نتائج تأثير الهاربين على بادرات القمح للمجموعة الأولى الجدول (11) زيادة معنوية في طول الجذير مقارنةً بالشاهد حيث كانت  $P\text{-value}$  أصغر من 0.01، وبلغ متوسط طول

الجذير 153.95 مم، في حين انخفض طول الجذير وبشكل معنوي في الشاهد الذي بلغ متوسط طوله 102.27 مم.

جدول (11) تأثير معاملة بذار القمح بالهاربين في نمو السويقة والجذير وعدد الجذور \*

| المعاملة        | متوسط طول الجذير / مم | متوسط طول السويقة / مم | متوسط عدد الجذور |
|-----------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| الشاهد          | 102.27 <sup>a</sup>   | 131.84 <sup>a</sup>    | 3 <sup>a</sup>   |
| الهاربين        | 153.95 <sup>b</sup>   | 170.03 <sup>b</sup>    | 3 <sup>a</sup>   |
| قيمة T المحسوبة | 43.78                 | 34.25                  | 0                |

\*: يشير اختلاف الأحرف ضمن العمود الواحد لوجود فروق معنوية بين المتوسطات

كذلك كانت الفروق معنوية بمتوسط طول السويقة بين البادرات المعاملة بالهاربين والشاهد جدول (10) حيث بلغ متوسط الطول في الشاهد 131.84 مم، وازداد معنوياً في البادرات المعاملة بالهاربين فبلغ متوسطه 170.03 مم، وكانت قيمة p-value أقل من 0.01، أي إن تأثير الهاربين في نمو بادرات القمح كان متشابهاً في كل من المؤشرين طول السويقة والجذير، بينما لم تؤد معاملة بذور القمح بالهاربين إلى تغير معنوي في عدد الجذور.

أخذت بادرات المجموعة الثانية وقيست أوزانها الرطبة والجافة، وأظهر التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية (p-value أقل من 0.01) بين البادرات التي عوملت بذورها بالهاربين والمعاملة بالماء كشاهد، حيث كان متوسط الوزن الرطب لبادرات القمح المعاملة بالهاربين 1.2 ضعف متوسط الوزن الرطب للشاهد، وكذلك الوزن الجاف للبادرات المعاملة بالهاربين كان أعلى بنسبة 127% من الشاهد.

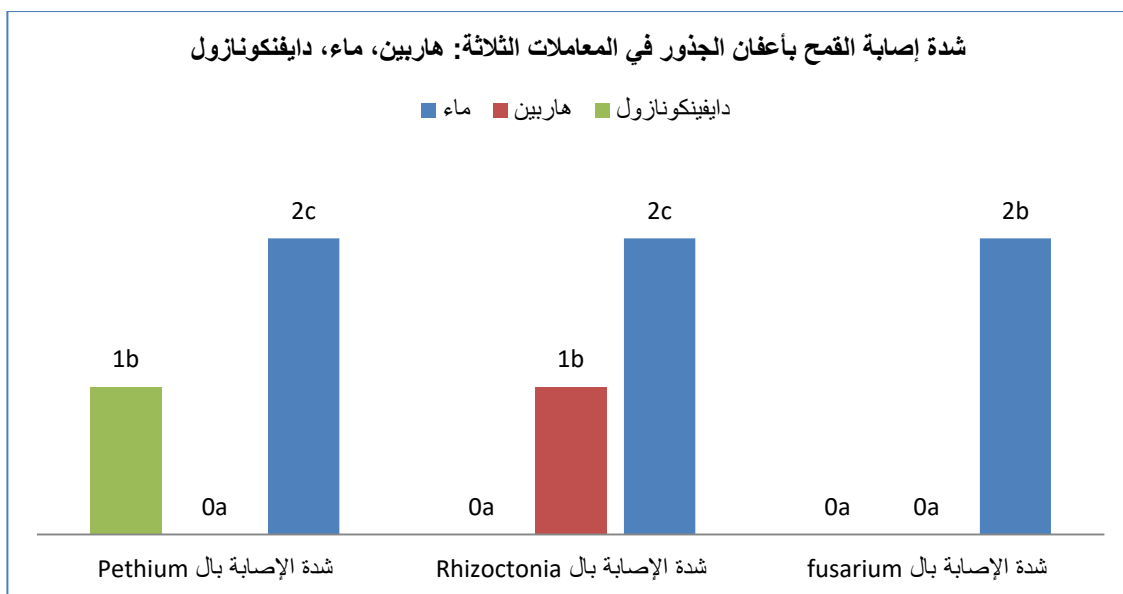
أي أن الزيادة المعنوية في أطوال السويقة والجذير رافقها زيادة معنوية في الأوزان الرطبة والجافة وبالتالي نجد أن الهاربين قد أسهم في زيادة الكتلة الحيوية لبادرات القمح وهذا موافق لما ذكر في (Choi *et al.*, 2013) بأن بروتين الهاربين يستخدم كمحفز لنمو النبات، توافق هذه النتائج الأولية ما وجدته Sands وآخرون (2022) بأن بروتين الهاربين زاد من طول بادرات القنب المعاملة ضعف طول الشاهد بعد أسبوع من المعاملة، ومع ما بينه

Dong (2004) بأن معاملة النبات بالهاربين قد أدت لزيادة في الوزن الرطب للنبات، وتؤكد ما وجده Chen وآخرون (2017) بأن نقع بذور القمح بالهاربين أدى لزيادة معنوية في طول الجذير والوزن الرطب والجاف، ويمكن أن تفسر زيادة الكتلة الحيوية لبادرات القمح نتيجة معاملتها بالهاربين لكون الهاربين وفقاً لـ (Li *et al.*, 2014) يؤدي في نبات الرز لتنشيط مسارات الايتلين وازدياد معدل الاصطناع الضوئي وتعبير مورثة EXP وبالتالي يعزز النمو الخضري.

**4-6-2 حساب تركيز اليخضور:** بعد أخذ القراءات على أطوال الأمواج السابقة حُسبت تراكيز اليخضور في المعاملتين وكان متوسط تركيز اليخضور بالمعاملة الأولى (هاربين) للمكررات الثلاث = 14.2 مغ / غ وزن رطب بينما انخفض معنوياً ( $p\text{-value} = 0.0003$  وقيمة  $T = 11.078$ ) وفق التحليل الإحصائي في الشاهد إلى 11.3 مغ / غ وزن رطب، وافقت الزيادة المعنوية لليخضور في البادات المعاملة بذورها بالهاربين مع ما أظهرته نتائج (Akbulak *et al.*, 2006) بأن معاملة الفليفلة بالهاربين زادت من محتوى الكلوروفيل الكلي وقللت الانخفاض بمحتوى الكلوروفيل في نباتات الفليفلة المعدية بفطر *Botrytis*.

**4-7 التأثير في مقاومة القمح لأعفان الجذور الشائعة:** من خلال استخدام سلم التقييس الثلاثي وجد أن البادات المعاملة بالماء كانت بدرجة إصابة = 2 عند العدوى بالفطور الثلاثة حيث غطت الإصابة أكثر من ربع السلامة تحت التاجية، بينما البادات المعاملة بالهاربين كانت درجة الإصابة = 0 في النباتات التي أعديت بفطر *Fusarium* و *Pythium* فلم تظهر على السلامة تحت التاجية أي تلون، أما في البادات المعدية بالفطر *Rhizoctonia* ظهر تلون بني خفيف لأقل من ربع السلامة تحت التاجية وبالتالي كانت درجة الإصابة = 1.

وبينت نتائج المعاملة بمعقم البذار الديفكونازول سلامة النباتات المعدة بفطر *Fusarium* و *Rhizoctonia* حيث كانت درجة الإصابة = 0، أما النباتات المعدية بالفطر *Pythium* ظهر تلون غطى ربع السلامة تحت التاجية، أي أنّ درجة الإصابة = 1، وبين التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين المعاملات موضحة بالدلالات الإحصائية الشكل (25).



الشكل (25) تأثير الهاربين مقارنة بالدايفنكونازول والماء في تحريض المقاومة لأعفان الجذور في القمح\*

\* تشير الأرقام فوق الأعمدة إلى درجة الإصابة، وتشير الأحرف المختلفة إلى وجود فروق معنوية ضمن كل عزلة فطرية على حدا

وبهذا نجد أن بروتين الهاربين أعطى فعالية وحرص مقاومة القمح لأعفان الجذور مقارنة بالشاهد الماء وكانت فعاليته ضد فطر *Fusarium* مماثلة لمعقم البذار دايفنكونازول، وتغوق على معقم البذار المستخدم عند العدوى بالفطر *Pythium* بينما كان المعقم أفضل منه عند العدوى بالفطر *Rhizoctonia*.

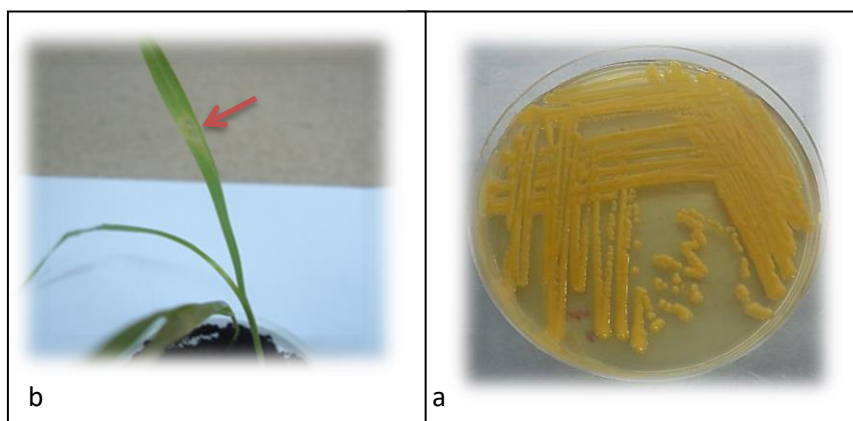
هذه النتائج موافقة لما أورده Choi وآخرون (2013) بأن العديد من الدراسات أظهرت فعالية بروتين الهاربين في تحريضه للمقاومة عند النباتات، فخفض استخدام الهاربين من نسبة الإصابة بعفن الفيقلية مقارنةً بالشاهد حسب Tezcan وآخرون (2013)، وخفض رش نبات البندورة ببروتين الهاربين من الإصابة بمرض اللبحة المتأخرة المسبب من الممرض *Phytophthora infestans* والعفن الرمادي *Botrytis cinerea* (Fontanilla et al., 2005).

وبذلك نجد أن الهاربين المنتج محلياً أعطى نتائج أولية جيدة في تحريض مقاومة القمح لأعفان الجذور وتعزيزه لنمو بادرته.

#### 4-8 تقييم فعالية بروتين الهاربين المؤشب في إمراضية بكتيريا التخطط الشفاف على القمح:

تميزت العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة (Xt10، Xt4.2)، عند زراعتها على وسط زرع (YPGA) بتشكيلهما مستعمرات صفراء لامعة دائرية محدبة ملساء منتظمة الحواف بقطر (3-4) ملم الشكل (26a)، احتاجت إلى 3 أيام لتنمو عند درجة 27 س. سالبة لصبغة غرام، سالبة لاختبار الأوكسيداز، تنفسها هوائي، لا تشكل سكر اللوفان، تسبب فرط الحساسية على التبغ، وهذا للمواصفات النموذجية لبكتيريا *Xanthomonas translucens* وفقاً لـ (Sands *et al.*, 1986؛ Adhikari *et al.*, 2012)

**4-8-1 القدرة الإمراضية للعزلات:** للتأكد من إمراضية العزلات أجريت العدوى الاصطناعية على بادرات قمح صنف شام 6 بمعلق بكتيري تركيزه  $10^8$  cfu / مل ومراقبة أعراض الإصابة خلال أسبوع من تاريخ العدوى حيث ظهرت أعراض الإصابة تشبع بالماء water soaking بعد 48 ساعة من العدوى واصفرار في الفترة اللاحقة الشكل (26b) وهذا موافق لما ذكره (Duveiller *et al.*, 1997) في أن أعراض العزلات الممرضة تكون عبارة عن تشبع بالماء واصفرار للأنسجة النباتية في منطقة العدوى الاصطناعية.



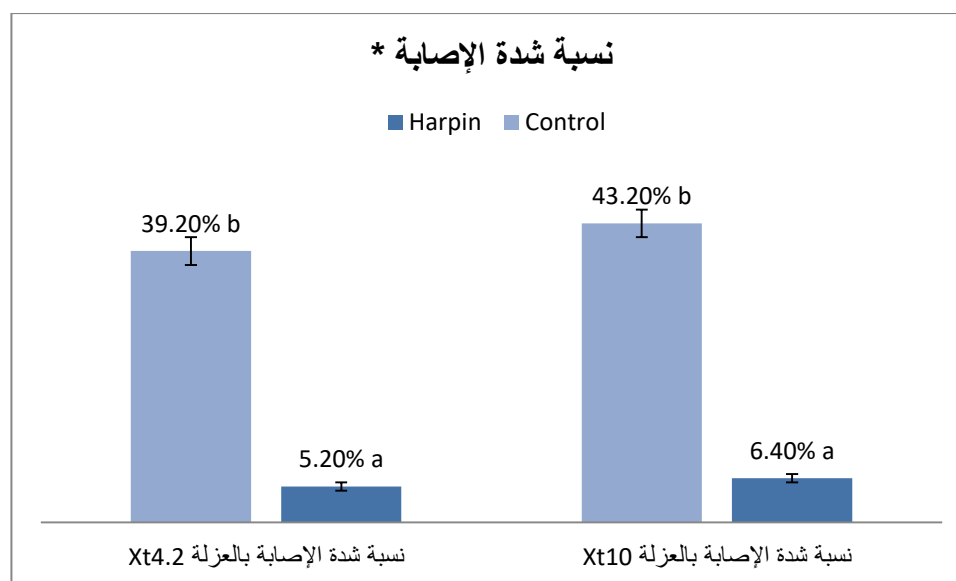
الشكل (26) a: مستعمرات بكتيريا *Xanthomonas translucens* على وسط نمو YPGA، b: أعراض اصفرار بعد

العدوى الاصطناعية ببكتيريا *Xanthomonas translucens* العزلة Xt10 على صنف القمح شام 6

#### 4-8-2 تأثير بروتين الهاربين في الحد من الشدة المرضية لـ Xt في القمح: بعد معاملة صنف القمح شام 6

بالحاربين والماء المقطر، والعدوى بالمعلق البكتيري للعزلتين المدروستين، أخذت قراءة شدة الضرر ضمن الأنسجة

النباتية اعتماداً على سلم تقييس (Duveiller *et al.*, 1994) و معادلة (Wheeler, 1970)، وأظهرت النتائج أن بروتين الهاربين قد خفض معنوياً من نسبة إصابة بادرات القمح صنف شام 6 ومن الشدة المرضية لبكتيريا التخطط الشفاف لكلا العزلتين مقارنة بالبادرات المرشوشة بالشاهد الماء، حيث ظهرت الإصابة وأعراض المرض على النباتات المعاملة بالهاربين في 13 من أصل 50 بادرة قمح (26%) عند العدوى بالمعلق البكتيري الأول وعلى 11 بادرة من أصل 50 (22%) بالنسبة للمعلق الثاني، وبنفس الوقت انخفضت الشدة حيث توزعت شدة الإصابة في البادرات المعاملة بالهاربين والمعدة بالمعلق الأول إلى الدرجة 1 (10 بادرات) والدرجة 2 (3 بادرات) من سلم التقييس أما المعدة بالمعلق الثاني فتوزعت إلى الدرجة 1 (9 بادرات) والدرجة 2 (بادرتين) ، بينما ارتفعت الشدة المرضية معنوياً في البادرات المعاملة في الماء حيث ظهرت الإصابة على كافة البذار المعدة بكلا العزلتين (نسبة الإصابة 100%) وتوزعت على الدرجات 1 (15 بادرة) و 2 (15 بادرة) و 3 (17 بادرة) و 4 (3 بادرة) بالنسبة للمعلق الأول والدرجات 1 (17 بادرة) و 2 (18 بادرة) و 3 (15 بادرة) للمعلق الثاني، وبلغت نسبة شدة الإصابة عند تطبيق معادلة (Wheeler 1970) 6.4% في البادرات المعاملة بالهاربين مقارنة بالشاهد الذي بلغت فيه نسبة شدة الإصابة 43.2% للمعلق الأول، وبلغت في البادرات المعديّة بالمعلق الثاني (5.2، 39.2)% بالنسبة للبادرات المعاملة بالهاربين والماء على التوالي الشكل (27)، أي معاملة الهاربين خفضت نسبة شدة الإصابة بالعزلتين إلى (14.8، 13.2) % على التوالي مقارنة بالشاهد، وهذا يدل على أن بروتين الهاربين المستخدم حفز الاستجابة الدفاعية والمقاومة الجهازية في القمح مما حد من تطور المرض وازدياد ظهور الأعراض في البادرات مقارنة بالشاهد الماء.

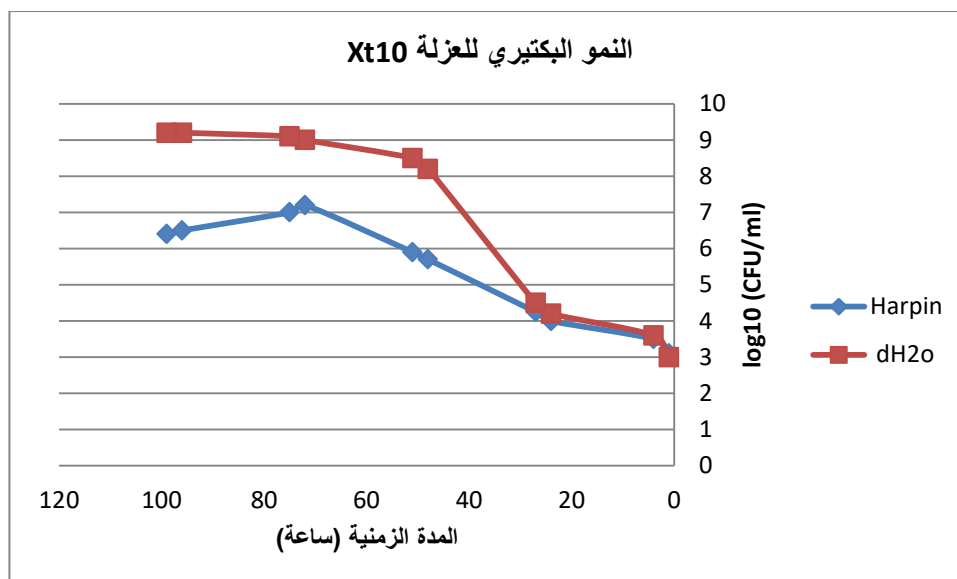


الشكل (27) نسبة شدة الإصابة بعزلتين من بكتيريا التخطط الشفاف على بادرات القمح صنف شام 6 المعاملة بالهاربين والمعاملة بالشاهد (الماء).

\*إختلاف الأحرف دلالة إحصائية على وجود فرق معنوي بين المتوسطين

هذه النتائج توافق العديد من الدراسات التي أظهرت فعالية لبروتين الهاربين في تخفيضه إمراضية البكتيريا النباتية وتقليل أعراض الإصابة وشدها مثل ما أظهرت نتائج Boro *et al.*, 2011 و Ahmad *et al.*, 2001، حيث أدى تطبيق الهاربين على النباتات إلى خفض أعراض الإصابة بمرض التبقع البكتيري للحمضيات والتبقع البكتيري على الفجل على التوالي واللذين ينجمان عن بكتيريا تتبع الجنس *Xanthomonas*.

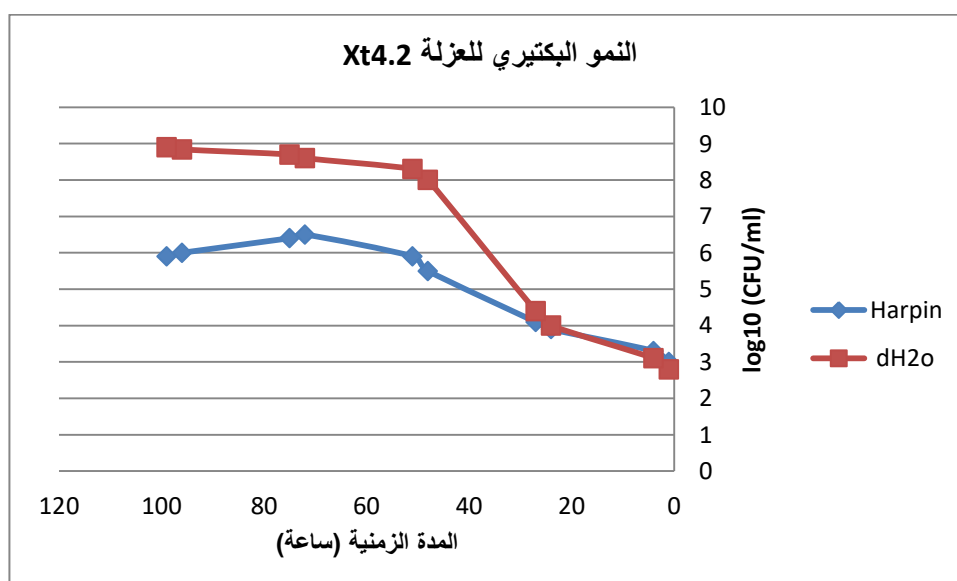
**4-8-3 تقييم النمو البكتيري بطريقة العد البكتيري:** أخذت قراءات العد البكتيري في معاملة الهاربين والشاهد على فترات زمنية مختلفة (1، 4، 24، 27، 48، 51، 72، 75، 96، 99) ساعة لكلا العزلتين، وبينت النتائج أن أوراق القمح المعاملة رشاً ببروتين الهاربين قد بدأ انخفاض النمو البكتيري فيها للعزلة Xt10 مقارنة بالشاهد بعد 72 ساعة من إجراء العدوى؛ حيث انخفض النمو البكتيري في الأوراق المعاملة بالهاربين 50 مرة مقارنة بالشاهد واستمر الانخفاض حتى وصل إلى 500 مرة أقل من الشاهد بعد 99 ساعة من العدوى الشكل (28).



الشكل (28) النمو البكتيري للعزلة الممرضة Xt10 على أوراق القمح المعاملة بالهاربين والشاهد الماء مع الزمن.

لم تختلف النتائج كثيراً بالنسبة للعزلة الثانية حيث بدأ الانخفاض في التعداد البكتيري بعد 72 ساعة من العدوى بالعزلة Xt4.2، وكان التعداد أقل بـ 120 مرة في النباتات المعاملة بالهاربين مقارنةً بالشاهد واستمر انخفاض التعداد البكتيري وكان أقل بـ 1000 مرة تقريباً من الشاهد بعد 99 ساعة من العدوى بالعزلة الممرضة Xt4.2.

الشكل (29).



الشكل (29) النمو البكتيري للعزلة الممرضة Xt4.2 على أوراق القمح المعاملة بالهاربين والشاهد الماء مع الزمن

يمكننا اعتبار أن التخفيض الحاصل في النمو البكتيري لكلا العزلتين في أوراق القمح المعاملة بالهاربين جيد وفعال حيث بينت عدة دراسات أن انخفاض تركيز البكتيريا كافٍ لتقليل وبائية المرض، كما أورد (Maraite *et al.*, 2007) بأنه يمكن تخفيض وبائية مرض التخطط الشفاف البكتيري بتخفيض حجم المجتمع البكتيري الأولي المسبب للعدوى، وكما أشار (Schaad, 1987) بأن البذور التي تكون حملتها البكتيرية أقل من 1000 خلية مكونة للمستعمرة (بكتيريا/غ) لا تحدث إصابة مرضية في الحقل. وأوضح (Schaad, 1988) بأنه ليس من الضروري الوصول إلى تركيز صفر بكتيريا/غ في البذور المعدة للزراعة الحقلية لكي نتفادى المرض.

بناءً على النتائج التي ظهرت في تقييم كفاءة بروتين الهاربين المؤشب تجاه بعض ممرضات القمح البكتيرية والفطرية المدروسة، تبين لنا بأن الهاربين قد أعطى كفاءة في التقليل المعنوي من نسبة وشدة الإصابة أعفان الجذور الشائعة ونسبة وشدة الإصابة والنمو البكتيري لبكتيريا التخطط الشفاف، وذلك على الأصناف المستخدمة التي تعد أصناف قابلة للإصابة أو حساسة، وهذا يعود بشكلٍ أكيد لقدرة بروتين الهاربين على تحريض مقاومة القمح، فكما رأينا في التجارب السابقة بأن معالجة بادرات القمح رشاً بالهاربين أدت إلى إرتفاع الفعالية الأنزيمية لأنزيمين يعدان من أهم الأنزيمات الدفاعية وهما البيروكسيداز والسوبركسيد دسموتاز، وبذلك سيرتفع تشكل اللجنين والتقلن وتدعيم الأنسجة الخلوية وإنتاج الفيتوألوكسينات المضادة للميكروبات (Almagro *et al.*, 2009; Chakraborty and Pradhan, 2012)، إضافة لمساهمتها الفعالة في تفكيك والتخلص من أشكال الأوكسجين الفعالة ROS وبالتالي زيادة تحمل النباتات للإجهادات الحيوية وغير الحيوية عند نباتات عدة (Zhang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020; Binici *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2023) كما قد يعود السبب أيضاً بأن الهاربين يؤدي لإرتفاع جزيئات أخرى في النبات لها علاقة بردود الفعل الدفاعية كأنزيم الفينيل ألانين والكاتلاز و pr-proteins وتنشيطه لأنزيمات MAPK كما ذكرت العديد من المراجع (Livaja, 2005; Li *et al.*, 2012)، وهذا ما يحتاج لدراسات لاحقة على القمح تؤكد ذلك وتحدد هذه الجزيئات بدقة.

## الفصل الخامس

### الاستنتاجات والتوصيات والمقترحات

### Conclusions and Recommendations

## 6- الاستنتاجات:

- بروتين الهاربين المؤشب من بكتيريا *E. amylovora* محلية وزنه الجزيئي 44 كيلو دالتون ويمتاز بثباتية حرارية.
- رش بروتين الهاربين على بادرات القمح حرض الفعالية الأنزيمية لأنزيم الـ SOD .
- ارتبطت زيادة الفعالية الأنزيمية للـ SOD بالتعبير المورثي لمورثة الـ SOD، أي تحريض الفعالية كان على مستوى نسخ المورثة.
- رش بروتين الهاربين على بادرات القمح حرض الفعالية الأنزيمية لأنزيم الـ POD .
- لم ترتبط زيادة الفعالية الأنزيمية للـ POD بالتعبير المورثي لمورثة الـ GPX إحدى مورثات البيروكسيداز، أي أن تحريض الفعالية إما لم يكن على مستوى نسخ المورثة، أو هناك مورثات أخرى مسؤولة عن الأنزيم قد زاد تعبيرها.
- زادت تراكيز الفلافونيدات الكلية بشكل معنوي في بادرات القمح نتيجة معاملتها بالهاربين.
- تعد زيادة فعالية الأنزيمين السابقين وتركيز الفلافونيدات في بادرات القمح بعد المعاملة بالهاربين مؤشر واضح لتحريض المقاومة في القمح.
- لم يظهر تأثير إيجابي لبروتين الهاربين في تحسين نسبة الإنبات، بالمقابل حسن من مؤشرات النمو الأولية للبادرات.
- أظهر بروتين الهاربين كفاءة جيدة في تحريض مقاومة القمح تجاه الممرضات المدروسة (أعفان الجذور الشائعة، ومرض التخطيط الشفاف).

## 6-1 التوصيات والمقترحات:

- استخدام الهاربين المؤشب على نبات القمح لرفع مقاومته للآفات المختلفة.
- إنتاج بروتين الهاربين المؤشب كبديل اقتصادي للمواد التجارية من الهاربين باهظة الثمن.
- دراسة جدوى إقتصادية لعملية إنتاج البروتين محلياً.
- دراسة التعبير المورثي لمورثات أخرى للبيروكسيداز لربط التعبير المورثي مع الفعالية الأنزيمية.
- دراسة تأثير الهاربين على مستويات جزيئات أخرى هامة بالعملية الدفاعية كالكاتالاز والفينيل ألانين امونيا-لياز والبروتينات المتعلقة بالإمراضية (Pr1, Pr2) في نبات القمح.
- إجراء أبحاث لدراسة تأثير تطبيق الهاربين على القمح لرفع تحمله للإجهادات اللاحيوية كالعطش والصقيع وغيرها.
- التوسع في دراسة تأثير الهاربين على محاصيل هامة أخرى.

## الفصل السادس

## المراجع العلمية

## References

## 6- المراجع:

## 1-6 المراجع العربية:

1. أسعد، سهام. (1987). مكافحة مرضي التفحم المغطى وتخطيط الأوراق البكتيري على القمح باستخدام كاسيات البذار. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة حلب، (قسم وقاية النبات). 149 صفحة.
2. الإبراهيمي، نبراس. (2015). تأثير المحتوى الرطوبي ونوع التربة في بعض المؤشرات الفسلجية والكيموحيوية لنبات الحنطة *Triticum aestivum* L. وعلاقة ذلك بالبوتاسيوم المضاف رسالة ماجستير، جامعة كربلاء كلية العلوم الصرفة قسم علوم الحياة، 115 ص.
3. الجواري، نهلة سالم حموك. (2004). نقع حبوب الحنطة (*Triticum aestivum* L.) بالأثلين كلايكل وتأثيره في النمو والإنتاجية وزيادة التحمل للأنجماد. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل. العراق. 153 صفحة.
4. الدخيل، بشار. (2020). فعالية فطر وبعض المبيدات في تطور بعض الفطريات المسببة لأعفان جذور القمح والشعير. المجلة السورية للبحوث الزراعية. 7(4): 397-407.
5. الصالح، إسماعيل. (2017). توصيف عزلات *Xanthomonas translucens* المسببة لمرض التخطيط البكتيري على القمح وتحليل معلوماتي حيوي لمعطياتها الجزيئية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق، (قسم وقاية النبات). 86 صفحة.
6. النائب، رنا؛ عمر يحياوي، أحمد الأحمد وميلودي نشيط. (2002). مسح حقلي لمرض تعفن الجذور الشائع على القمح والسعير في محافظتي حلب وإدلب (شمال سوريا). مجلة وقاية النبات العربية. 20: 131-136.
7. مندو، حجازي. (2007). توصيف الأمراض البكتيرية على النجيليات في سورية، وتفاعلها مع المصادر الوراثية للقمح. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق، (قسم وقاية النبات). 107 صفحة.

## 8. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. (2020). المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية.

## 2-6 المراجع الأجنبية:

1. Abeles, F. B., Dunn, L. J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R. E., and Schmidt, J. (1988). Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant physiology*, 87(3), 609-615.
2. Abeles, F. B., Dunn, L. J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R. E., and Schmidt, J. (1988). Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant physiology*, 87(3), 609-615.
3. Adhikari, T.B., Gurung, S., Hansen, J. M., and Bonman, J. M and Bonman, M. (2012). Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. *Phytopathology* 102 (4):390-402.
4. Ahmad, M., Majerczak, D. R., Pike, S., Hoyos, M. E., Novacky, A., and Coplin, D. L. (2001). Biological activity of harpin produced by *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(10), 1223-1234.
5. Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, 17(2), 73-90.
6. Akbudak, N. U. R. A. Y., Tezcan, H., Akbudak, B., and Seniz, V. (2006). The effect of harpin protein on plant growth parameters, leaf chlorophyll, leaf colour and percentage rotten fruit of pepper plants inoculated with *Botrytis cinerea*. *Scientia Horticulturae*, 109(2), 107-112.
7. Akhtar, M.A and Bhutta, M.R. (2002). Detection of bacterial pathogens in seeds of wheat, paddy and cotton in Pakistan. *Pakistan J. Agric. Res.* 17 (3):273-281.
8. Alikamanoglu, S., and Sen, A. (2011). Stimulation of growth and some biochemical parameters by magnetic field in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue cultures. *African Journal of Biotechnology*, 10(53), 10957.
9. Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., and Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of experimental botany*, 60(2), 377-390.

10. **Al-Sadi, A. M. (2021).** Bipolaris sorokiniana-induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: A review. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 584899.
11. **Amaya, I., Botella, M. A., de la Calle, M., Medina, M. I., Heredia, A., Bressan, R. A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A. and Valpuesta, V. (1999).** Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *Febs Letters*, 457(1), 80-84.
12. **Akhtar, A. (2021).** Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Protein Utilizing Bacterial Expression System. *Acta Scientific Microbiology* 4(11): 82-94.
13. **Baek, K. H., and Skinner, D. Z. (2003).** Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science*, 165(6), 1221-1227.
14. **Bayles, R., Flath, K., Hovmøller, M., and de Vallavieille-Pope, C. (2000).** Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie*, 20(7), 805-811.
15. **Bektas, Y., and Eulgem, T. (2015).** Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in plant science*, 5, 804.
16. **Binici, S., Çelik, C., Yildirim, F., and Yildirim, A. (2022).** Determination of the effect of harpin protein on nacl salt stress in pistachio (*Pistacia Vera* L.) seeds. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 11(2), 141-150.
17. **Boro, M. C., Beriam, L. O. S., and Guzzo, S. D. (2011).** Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* sp. *passiflorae* in passion fruit plants. *Tropical Plant Pathology*, 36(2), 74-80.
18. **Bradford M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
19. **Bundó, M., and Coca, M. (2016).** Enhancing blast disease resistance by overexpression of the calcium-dependent protein kinase Os CPK 4 in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 14(6), 1357-1367.
20. **Chakraborty, U., and Pradhan, B. (2012).** Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their

- antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 24, 117-130.
21. **Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
  22. **Chen, L., Qian, J., Qu, S., Long, J., Yin, Q., Zhang, C., Wu, X., Sun, F., Wu, T., Hayes, M. and Beer, S.V. (2008).** Identification of specific fragments of HpaGXooc, a harpin from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, that induce disease resistance and enhance growth in plants. *Phytopathology*, 98(7), 781-791.
  23. **Chen, Y., Tan, S., Yang, F., Chen, Z., Wu, Z., and Huang, J. (2017).** Soluble expression and purification of a functional harpin protein in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 57, 200-206.
  24. **Chitnis, V. R., Nguyen, T. N and Ayele, B. T. (2016).** A simple and efficient approach to elucidate genomic contribution of transcripts to a target gene in polyploids: the case of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7, 1597.
  25. **Choi, M. S., Kim, W., Lee, C., and Oh, C. S. (2013).** Harpins, multifunctional proteins secreted by Gram-negative plant-pathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(10), 1115-1122.
  26. **Chuang, H. W. (2017).** The Dual Function of Harpin in Disease Resistance and Growth in *Phalaenopsis* Orchids. In *Orchid Biotechnology* Iii. (pp. 309-329).
  27. **Cyprus, T., and Pratico, D. (2006).** Antioxidants and Chronic Vascular Disease: Animal Studies. In *Antioxidants and Cardiovascular Disease* (pp. 227-253). Boston, MA: Springer US.
  28. **de Capdeville, G., Beer, S. V., Watkins, C. B., Wilson, C. L., Tedeschi, L. O., and Aist, J. R. (2003).** Pre-and post-harvest harpin treatments of apples induce resistance to blue mold. *Plant Disease*, 87(1), 39-44.
  29. **Delannoy E., Lyon B., Marmey P., Jalloul A., Daniel J., Montillet J., Essenberg M., Nicole M. (2005).** Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43: 63–82.

30. **Desikan, R., Hancock, J. T., Ichimura, K., Shinozaki, K., and Neill, S. J. (2001).** Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology*, 126(4), 1579-1587.
31. **Doke, N. (1983).** Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato-tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23 345–357.abstract.
32. **Dong, H. P., Peng, J., Bao, Z., Meng, X., Bonasera, J. M., Chen, G., Dong, H.P., Peng, J., Bao, Z., Meng, X., Bonasera, J.M., Chen, G., Beer, S.V.and Dong, H. (2004).** Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiology*, 136(3), 3628-3638.
33. **Dong, H., Delaney, T. P., Bauer, D. W., and Beer, S. V. (1999).** Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *The Plant Journal*, 20(2), 207-215.
34. **Dudziak, K., Zapalska, M., Börner, A., Szczerba, H., Kowalczyk, K., and Nowak, M. (2019).** Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. *Scientific Reports*, 9(1), 2743.
35. **Duveiller, E. (1989).** Research on '*Xanthomonas translucens*' of wheat and triticale at CIMMYT. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 19(1):97-103.
36. **Duveiller, E. (1994).** A pictorial series of disease assessment keys for bacterial leaf streak of cereals. *Plant Disease* 78(2):137-141.
37. **Duveiller, E., and Maraite, H. (1993).** Study of yield loss due to *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in wheat under high rainfall temperate conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 100(5):453-459.
38. **Duveiller, E., Fucikovsky, L and Rudolph, K, eds. (1997).** The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT. 78 p.

39. **Environmental Protection Agency.(2019).**// US EPA, Pesticide Product Label, PHC-620,04/04/.
40. **Espelie, K. E., Franceschi, V. R., and Kolattukudy, P. E. (1986).** Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiology*, 81(2), 487-492.
41. **Fonseca, J. M., Kim, H. J., Kline, W. L., Wyenandt, C. A., Hoque, M., Ajwa, H., and French, N. (2009).** Effect of preharvest application of a second-generation harpin protein on microbial quality, antioxidants, and shelf life of fresh-cut lettuce. *Journal of the American society for horticultural science*, 134(1), 141-147.
42. **Fontanilla , J. M., Montes, M., and De Prado, R. (2005).** Induction of resistance to the pathogenic agent *Botrytis cinerea* in the cultivation of the tomato by means of the application of the protein" Harpin"(Messenger). *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(3), 35-40.
43. **Fontanilla, M., Montes, M., and De Prado, R. (2005).** Effects of the foliar-applied protein" Harpin (Ea)"(messenger) on tomatoes infected with *Phytophthora infestans*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(3), 41-45.
44. **Gamir, J., Darwiche, R., Van't Hof, P., Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., and Mauch, F. (2017).** The sterol-binding activity of Pathogenesis-Related Protein 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *The Plant Journal*, 89(3), 502-509.
45. **Gen, K., Okuzawa, K., Kumakura, N., Yamaguchi, S., and Kagawa, H. (2001).** Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biology of Reproduction*, 65(4), 1186-1194.
46. **Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Goltapeh, E. M., Safaie, N., and Razavi, K. (2016).** Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with *Mycosphaerella graminicola*. *Scientiaagriculturaebohemia*, 47(1), 1-8.

47. **Gianinazzi, S., and Kassanis, B. (1974).** Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid. *Journal of General Virology*, 23(1), 1-9.
48. **Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K. (1977).** Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314.
49. **Gill, S and N. Tuteja. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12):909–930.
50. **Gupta, N. K., Agarwal, S., Agarwal, V. P., Nathawat, N. S., Gupta, S., and Singh, G. (2013).** Effect of short-term heat stress on growth, physiology and antioxidative defence system in wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 1837-1842.
51. **Haapalainen, M., Engelhardt, S., Kuefner, I., LI, C. M., Nuernberger, T., Lee, J., Romantschuk, MandTaira, S. (2011).** Functional mapping of harpinHrpZ of *Pseudomonassyringae* reveals the sites responsible for protein oligomerization, lipid interactions and plant defence induction. *Molecular Plant Pathology*, 12(2), 151-166.
52. **Hadwiger, L.A., Beckman, J.M. (1980).** Chitosan as a Component of Pea-*Fusarium solani* Interactions. *Plant Physiology*, 66(2), 205–211.
53. **He, S. Y., Huang, H. C., andCollmer, A. (1993).** *Pseudomonas syringae*pv. *syringae*harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 73(7), 1255-1266.
54. **Iakimova, ET., Michalczuk, L., Woltering, EJ. (2005).** Hypersensitive cell death in plants its mechanisms and role in plant defence against pathogens. *J Fruit Ornam Plant Res.* 13:135–158.
55. **Jang, Y. S., Sohn, S. I., and Wang, M. H. (2006).** The *hrpN* gene of *Erwiniaamylovora* stimulates tobacco growth and enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Planta*, 223(3), 449-456.
56. **Jeong, H., Kim, H. J., and Lee, S. J. (2015).** Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. *Genome announcements*, 3(2), 10-1128.

57. Jiang, W., Yang, L., He, Y., Zhang, H., Li, W., Chen, H., Ma, D. and Yin, J. (2019). Genome-wide identification and transcriptional expression analysis of superoxide dismutase (SOD) family in wheat (*Triticum aestivum*). *PeerJ*, 7, e8062.
58. Jones, J.D., Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444,323- 329.
59. Jwa, N. S., and Hwang, B. K. (2017). Convergent evolution of pathogen effectors toward reactive oxygen species signaling networks in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1687
60. Kadota, Y., Shirasu, K., Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. Invited Review. *Plant Cell Physiol.* 56(8): 1472–1480.
61. Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A. K., Singh, R. K., & Kumar, P. (2020). Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens. *Fungal biotechnology and bioengineering*, 457-470.
62. Kayim, M., Nawaz, H., and Alsalm, A. (2022). Fungal diseases of wheat. In *Wheat*. IntechOpen.
63. Keshkeih, R. A., Abu-Ghorrah, M., and Jalloul, A. (2019). Exopolysaccharides from *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum* induce resistance in cotton against bacterial blight. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 100(2).
64. Keshkeih, R.(2014).Induction of Cotton Resistance (*Gossypium hirsutum*) to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by Chemical and Biological Materials. Master Thesis. Damascus University.p:94.
65. Khanacademy.(2020).<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/overview-dna-cloning>.
66. Kielkopf, C. L., Bauer, W., and Urbatsch, I. L. (2021). Expressing cloned genes for protein production, purification, and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(2), pdb-top102129.
67. Kim, H.K., Orser, C., Lindow, S.E., and Sands, D.C. (1987). *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. *Plant Disease* 71(11):994-997.

68. Klement, Z., Farkas, G.L., Lovrekovich, L. (1964) Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
69. Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., and Suzuki, Y. (2015). Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PloS one*, 10(9), e0137466.
70. Kothari, I. L., & Patel, M. (2004). Plant immunization. *Indian journal of Experimental biology*.42, 244-252.
71. Krause, M., and Durner, J. (2004). Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(2), 131-139.
72. Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
73. Ledingham, R. J., Atkinson, T. G., Horricks, J. S., Mills, J. T., Piening, L. J., and Tinline, R. D. (1973). Wheat losses due to common root rot in the prairie provinces of Canada, 1969-71. *Can. Plant Dis. Surv*, 53, 113-122.
74. Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S.E., Metraux, J.P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112; 54–62.
75. Leonowicz, G., Trzebuniak, K. F., Zimak-Piekarczyk, P., Ślesak, I., and Mysliwa-Kurdziel, B. (2018). The activity of superoxide dismutases (SODs) at the early stages of wheat deetiolation. *Plos One*, 13(3), e0194678.
76. Li, M., Yu, M. L., Zhang, Z. Q., Liu, Q. N., Wu, Y. C., and Liu, Z. G. (2013). Effects of Harpin protein on fruit quality and shelf life of winter jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. cv. *Dongzao*). *Biological agriculture & horticulture*, 29(1), 58-68.
77. Li, M., Yu, M. L., Zhang, Z. Q., Wu, Y. C., Liu, Z. G., and Zhao, C. H. (2012). Harpin induces rust disease (*Phakopsora zizyphi-vulgaris*) resistance on winter jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. cv. *Dongzao*). *Biological Agriculture & Horticulture*, 28(3), 177-184.
78. Li, X., Han, B., Xu, M., Han, L., Zhao, Y., Liu, Z., Dong, H and Zhang, C. (2014). Plant growth enhancement and associated physiological responses are

- coregulated by ethylene and gibberellin in response to harpin protein Hpa1. *Planta*, 239, 831-846.
79. **Liu, R., Lü, B., Wang, X., Zhang, C., Zhang, S., Qian, J., Chin, L., Shi, H., and Dong, H. (2010).** Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in *Arabidopsis*. *Journal of biosciences*, 35(3), 435-450.
  80. **Livaja, M. (2005).** The action of the bacterial effector protein harpin on *Arabidopsis thaliana*. Ph.D thesis, Technical University of Munich. 116p
  81. **Luna, E., Bruce, T.J., Roberts, M.R., Flors, V., Ton, J. (2012).** Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 158, 844–853.
  82. **Manavalan, L. P., and Nguyen, H. T. (2017).** Drought tolerance in crops: physiology to genomics. In *Plant stress physiology* (pp. 1-23). Wallingford UK: CABI.
  83. **Maraite, H., Bragard, C., and Duveiller, E. (2007).** The status of resistance to bacterial diseases of wheat. In *wheat production in stressed environments*. Springer, New York. 37-49
  84. **Marmey P., Jalloul A., Alhamdia M., Assigbetse K., Cacas J., Voloudakis A., Champion A., Clerivet A., Montillet J., Nicole M. (2007).** The 9-lipoxygenase GhLOX1 gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris pv malvacearum*. *Plant Physiol. Biochem.* 45: 596–606.
  85. **Martinez, C., Baccou, J. C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J. F., Jalloul, A., Montillet J., Geiger J, Assigbetsé K, and Nicole, M. (2000).** Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris pv malvacearum*. *Plant Physiology*, 122(3), 757-766.
  86. **Martinez, C., Geiger, J. P., Bresson, E., Daniel, J. F., Dai, G. H., Andary, A., and Nicole, M. (1996).** Isoperoxidases are associated with resistance of cotton to *Xanthomonas campestris PV malvacearum*. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Edited by C. Obinger, U. Burner, R. Ebermann, C. Penel & H. Greppin: University of Geneve

87. **Maurya, R., Namdeo, M. (2022).** Superoxide dismutase: a key enzyme for the survival of intracellular pathogens in host [Intechopen], <https://doi.org/10.5772/intechopen.100322>
88. **McDowell, J. M., and Woffenden, B. J. (2003).** Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology*, 21(4), 178-183.
89. **McDowell, J.L. Dangl.(2000).** Signal transduction in the plant immune response, *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2), 79-82.
90. **Mehta, Y.R. (1990).** Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and *hordei* through cereal seed testing. *Seed Science and Technology*. 18(2):467-476.
91. **Miyamoto, S. I., Ochiai, A., Boku, N., Ohtsu, A., Tahara, M., Yoshida, S., Okabe, H., Takechi, T. and Fukushima, M. (2001).** Discrepancies between the gene expression, protein expression, and enzymatic activity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human gastrointestinal cancers and adjacent normal mucosa. *International journal of oncology*, 18(4), 705-713.
92. **Moore, J., Liu, J. G., Zhou, K., and Yu, L. (2006).** Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5313-5322.
93. **Moore, K., Manning, B., Simpfendorfer, S., and Verrell, A. (2005).** Root and crown diseases of wheat and barley in Northern NSW. *NSW Department of Primary Industries: Orange, NSW, USA*.
94. **National Center for Biotechnology Information (2023).** PubChem Compound Summary for CID 139584351, Harpin. Retrieved December 1, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Harpin>.
95. **Niri, M. D., Tarighi, S., and Taheri, P. (2023).** Defense activation in wheat against *Xanthomonas translucens* via application of biological and chemical inducers. *Journal of Plant Pathology*, 1-13.
96. **Passardi, F., Longet, D., Penel, C., and Dunand, C. (2004).** The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65(13), 1879-1893.

97. **Patade, V. Y., Bhargava, S., and Suprasanna, P. (2012).** Effects of NaCl and iso-osmotic PEG stress on growth, osmolytes accumulation and antioxidant defense in cultured sugarcane cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108, 279-286.
98. **Pavli, O. I., Kelaidi, G. I., Tampakaki, A. P., and Skaracis, G. N. (2011).** The *hrpZ* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. *PloS one*, 6(3), e17306.
99. **Peng, J. L., Bao, Z. L., Ren, H. Y., Wang, J. S., and Dong, H. S. (2004).** Expression of harpinXoo in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. *Phytopathology*, 94(10), 1048-1055.
100. **Peng, J. L., Dong, H. S., Dong, H. P., Delaney, T. P., Bonasera, J. M., and Beer, S. V. (2003).** Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the *NDR1* and *EDS1* genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(6), 317-326.
101. **Perino, C., Gaudriault, S., Vian, B., and Barny, M. A. (1999).** Visualization of harpin secretion in planta during infection of apple seedlings by *Erwinia amylovora*. *Cellular microbiology*, 1(2), 131-141.
102. **Pittner, E., Marek, J., Bortuli, D., Santos, L. A., Knob, A., and Faria, C. M. D. R. (2019).** Defense responses of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) against brown spot as a result of possible elicitors application. *Arquivos do Instituto Biológico*, 86.
103. **Ramzan, M., Sana, S., Javaid, N., Shah, A. A., Ejaz, S., Malik, W. N., Yasin, N.A., Alamri, S., Siddiqui, M.H and Danish, S. (2021).** Mitigation of bacterial spot disease induced biotic stress in *Capsicum annuum* L. cultivars via antioxidant enzymes and isoforms. *Scientific Reports*, 11(1), 9445.
104. **Razak, H. A., Lee, L. L., Sainuddin, N., Hamzah, R., Zainol, N. F., and Mihat, O. (2021).** Exercise and obesity: activation of antioxidative pathway against oxidative stress. *International Journal of Medicine and Sciences*, 6(1), 54-64.

105. **Reboutier, D., Frankart, C., Briand, J., Biligui, B., Rona, J. P., Haapalainen, M., Barny, M.A., and Bouteau, F. (2007).** Antagonistic action of harpin proteins: HrpWea from *Erwinia amylovora* suppresses HrpNea-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Cell Science*, 120(18), 3271-3278.
106. **Reuveni, M., Zahavi, T., Cohen, Y. (2001).** Controlling downy mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasitica* 29: 125-133. Abstract .
107. **Sands, D.C., Kim, H.K., and Hall, V. (1981).** *Xanthomonas* leaf streak of barley. In: *Proceedings of the Barley Diseases and Associated Breeding Methodology Workshop*, Rabat, Morocco. 173-182.
108. **Sands, D.C., Mizrak, G., Hall, V.N., Kim, H.K., Bockelman, H.E., and Golden, M.J. (1986).** Seed transmitted bacterial diseases of cereals: Epidemiology and control. *Arab Journal of Plant Protection* 4:127-125.
109. **Sands, L. B., Cheek, T., Reynolds, J., Ma, Y., and Berkowitz, G. A. (2022).** Effects of Harpin and Flg22 on Growth Enhancement and Pathogen Defense in *Cannabis sativa* Seedlings. *Plants*, 11(9), 1178.
110. **Schaad, N.W. (1987).** The use and limitations of methods to detect seed borne bacteria. In: *Seed Pathology, International Advanced Course*. Passo Fundo, RS, Brazil. 2:324-332.
111. **Schaad, N.W. (1988).** Bacteria. In: *Symposium on Inoculum Thresholds of Seed-borne Pathogens*. 76th Annual Meeting of the American Phytopathological Society. *Phytopathology* 78:872-875.
112. **Scheich, C., Sievert, V., and Büssow, K. (2003).** An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. *BMC biotechnology*, 3, 1-8.
113. **SDSU Extension.(2022).** <https://extension.sdstate.edu/wheat-diseases-identification-pocket-guide>.
114. **Seybold, H., Trempe, F., Ranf, S., Scheel, D., Romeis, T., Lee, J. (2014)**  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to  $\text{Ca}^{2+}$  decoding mechanisms. *New Phytol.* 204, 782–790.

115. Silva, I.T., Rodriggues ,F.A., Oliveira, J.R., Pereira ,S.C., Andrade, C.C.L., and Coneicao, M.M. (2009). Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. *Journal of Phytopathology*. 158(4):253-262.
116. Simmonds, N.W. and S. Rajaram. (1988). Breeding strategies for resistance to rusts of wheat. CIMMYT: Mexico, D. F. 151 pp.
117. Singh, R., Dangol, S., Chen, Y., Choi, J., Cho, Y.S., Lee, J. E. (2016). *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pii helps to establish compatibility by inhibition of the rice NADP-malic enzyme resulting in disruption of oxidative burst and host innate immunity. *Mol. Cells* 39, 426–438.
118. Sinn, J. P., Oh, C. S., Jensen, P. J., Carpenter, S. C., Beer, S. V., and McNellis, T. W. (2008). The C-terminal half of the HrpN virulence protein of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* is essential for its secretion and for its virulence and avirulence activities. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(11), 1387-1397.
119. Stakman, EC. (1915). Relation between Puccinia graminis and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agricultural Research* 4, 193–199.
120. Tezcan, H., Akbudak, N., and Akbudak, B. (2013). The effect of harpin on shelf life of peppers inoculated with *Botrytis cinerea*. *Journal of food science and technology*, 50, 1079-1087.
121. Tian, S., Liang, B., Li, T., Li, Y., Wang, Q., and Liu, C. (2023). Harpin enhances antioxidant nutrient accumulation and decreases enzymatic browning in stored soybean sprouts. *Open Chemistry*, 21(1), 20220330.
122. Tinline, R. D. (1994). Etiology of prematurity blight of hard red spring wheat and durum wheat in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 87-92.
123. Tripathi, D., Raikhy, G., and Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance—Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*, 17, 48-59.
124. Vallad, G.E., Goodman, R.M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.* 44:1920-1934.
125. Vector database. (2020). [addgene.org/vector-database/3509](https://addgene.org/vector-database/3509).

126. Voloudakis, A. E., Marmey, P., Delannoy, E., Jalloul, A., Martinez, C., and Nicole, M. (2006). Molecular cloning and characterization of Gossypium hirsutum superoxide dismutase genes during cotton–*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* interaction. *Physiological and molecular plant pathology*, 68(4-6), 119-127.
127. Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., and Valcke, R. (2013). Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: state of the art. *Microbiology*, 159(5), 823-832.
128. Walters, D., Newton, A. C., and Lyon, G. (Eds.). (2008). Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. John Wiley & Sons.
129. Walters, D.R., Ratsep, J., Havis, N.D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of experimental botany*, 64(5), 1263-1280.
130. Wang, D., Wang, B., Wang, J., Wang, S., Wang, W., and Niu, Y. (2020). Exogenous application of harpin protein Hpa1 onto *Pinellia ternata* induces systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, 110(6), 1189-1198.
131. Ward, H.M. (1902). On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust. *Puccinia dispersa* (Erikss). *Annals of Botany* 16, 233–315.
132. Wei, Z. M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, H., and Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257(5066), 85-88.
133. Welinder, K. G., Justesen, A. F., Kjærsgård, I. V., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Jespersen, H. M., and Duroux, L. (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6063-6081.
134. Wheeler, B.E.J. (1970). An introduction to plant diseases. John Wiley and Sons. Ltd. London, New York, Sydney, Toronto. 374p.
135. Whetten, R. W., MacKay, J. J., and Sederoff, R. R. (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 49(1), 585-609.

136. **Xie, Z., and Chen, Z. (2000).** Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 183-190.
137. **Young, S.K., Huang, Y.T. (1993).** Effects of Bactericides Probenazole, Streptomycin and Tecloftalam on Bacterial Leaf Blight of Rice. (14), 50-54.
138. **Zhang, L., Xiao, S., Li, W., Feng, W., Li, J., Wu, Z and Shao, M. (2011).** Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *Journal of experimental botany*, 62(12), 4229-4238.
139. **Zillinsky, F.J. (1983).** Common diseases of small grain cereals: a guide to identification. Mexico, DF, CIMMYT. 141p.

## Abstract

This study was conducted in Plant Bacterial Diseases lab at Damascus university - faculty of Agriculture, and Molecular Biology lab at National Commission for Biotechnology, In this research, recombinant Harpin<sub>Ea</sub> protein was used, the native source for it is the bacterium *Erwinia amylovora*, which causes fire blight on apple. At the Atomic Energy Commission, *HrpN* gene which is responsible for producing this protein, was cloned into the Pmal C2 plasmid, then modified Pmal C2 plasmid was introduced into transformation-efficient *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain. After ensuring the accuracy of insertion, the modified plasmids were isolated and introduced into expression strain "*E.coli* BL21". The total protein was obtained, which Harpin was purified from was performed using amylose resin column.

Harpin purity and its molecular weight was studied using SDS-PAGE method, clear band was obtained that had a molecular weight of 44 kDa, which is the Molecular weight of harpin protein in *E.amylovora*, also thermal stability of Harpin was tested as a one of important characteristics. It was exposed to different temperatures (30, 45, 60, 70, 80 C) for 5 minutes, then Harpin was injected into tobacco leaves after cooling Harpin to room temperature, after that Hypersensitivity reaction (HR) at tobacco was noted, the result showed appearance HR at tobacco leaves.

After confirming the characteristics of Harpin protein, its efficiency in inducing defense reactions in wheat plants was studied. Harpin was applied on 10-day wheat seedlings by spraying, to study its effect in increasing wheat resistance by measuring the activity of superoxide dismutase (SOD) enzyme, sterilized distilled water was used as a control, samples were collected from plants at (0, 1, 2, 4, 18, 24, 48, 72, 96) hour post-treatment and stored at -70°C, total protein was extracted from frozen samples ,their concentrations were estimated using Bradford assay.

Superoxide Dismutase (SOD) activity was determined by using spectrophotometer assay for the protein extracts of all post-treatment samples, the results showed increasing in the activity of the SOD enzyme in wheat seedlings which were treated with Harpin protein compared to ones which were treated with distilled water, the noticeable increase in the effectiveness of the enzyme began from 18 hour after spraying, and were still increasing to 96 hours post-treat, where they reached 2.68 times the concentration of the enzyme in the control samples, The SOD activity was determined by native polyacrylamide electrophoresis for post-treated-samples, the

enzyme was detected through the transparent bands that appear as a result of the competing between SOD and Nitro Blue Tetrazolium (NBT), the density of these bands increased in the samples treated with Harpin from 18 hours after spraying, compared to samples treated with water for these times, whose density remained approximately at the same degree. Gene expression of zn-SOD was studied by reverse transcriptase polymerase chain reaction (rt-PCR) and electrophoresis on agarose gel, *actin* expression used as an internal control, the results showed gradual increase in the density of the zn-SOD bands in post- Harpin treatment samples, the highest band density was at 96 hours post-treatment with Harpin in comparison with control which is treated with water. On the other hand, the study of actin gene expression showed, the same density of bands in post-treatment samples in both treatments (Harpin and water) i.e gene expression was constant, which indicates that the effect of Harpin protein on stimulating the SOD enzyme activity is by increasing its gene expression.

Also, the efficiency of spraying wheat seedlings with the recombinant Harpin<sub>Ea</sub> protein was evaluated in increasing the activity of the peroxidase enzyme (POD), spectrophotometry and polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) assays were used for that, the results of enzyme activity measurement by spectrophotometer showed increasing in POD activity at wheat seedlings which were treated with Harpin compared to seedlings that were treated with water (control). The highest activity of the enzyme was at 72 hours post-treatment with Harpin compared to control (it reached 1.828 times concentration of the enzyme in the control), then it had decreased slightly at 96 hours after spraying. Detection of POD enzyme activity by polyacrylamide electrophoresis (Native-PAGE) confirmed the last result, electrophoresis showed that the density and intensity of the peroxidase bands gradually increased in samples treated with Harpin and reached the highest effectiveness (the highest density and intensity of the resulting band) at 72 hours post-treatment with Harpin, then the band density decreased slightly at 96 hours post-treatment with Harpin. Gene expression of *GPX* (one of the genes responsible for peroxidase enzyme) was conducted, and was compared to gene expression of *Taβ-actin* gene as internal control on agarose gel. The results showed stability in gene expression by time for both genes, whether in wheat seedlings treated with water or seedlings treated with Harpin, i.e. there wasn't any effect of treating wheat with harpin protein on the *GPX* gene expression, which indicates that gene expression isn't the

effect of Harpin protein in stimulating activity of peroxidase enzyme, maybe there are other genes that play a role in increasing its activity.

The effect of Harpin on concentration of total flavonoids in wheat was studied using aluminum chloride colorimetric method, and showed double increasing in harpin treatment, compared to control treatment at 96 h post-treatment samples.

Also, the effect of Harpin protein on the growth of wheat was evaluated. The percentage of germination, root and peduncle length, number of roots, wet and dry seedling weight, and chlorophyll concentration were recorded as primary indicators of growth. The experiment showed that there was a significant effect of Harpin on length of root and peduncle and in wheat seedlings compared to the control. Also, there was a significant increase in wet and dry weight of seedlings treated with Harpin, the amount of chlorophyll had increased significantly from 11.2 mg/g in the control to 14.2 mg/g in the seedlings treated with Harpin.

On the other hand, the effect of Harpin protein in inducing wheat resistance to root rot disease was studied. Three fungal isolates of *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* were used in this study to infect the Bohoth 5 variety which is susceptible to this disease. Harpin was compared with water and difenconazole. the results showed that Harpin protein stimulated defense response in wheat against root rots, in comparison to control.

The activity of Harpin protein in reducing the pathogenicity of the Bacterium *Xanthomonas translucens* which caused Bacterial leaf streak (BLS) on wheat was evaluated. Two isolates of the pathogen Xt10 and Xt4.2, and the wheat cultivar Sham 6 which is susceptible to disease were used. Harpin treatment showed decreasing in infection severity in both isolates (14.8, 13.2)%. respectively compared to the control; Whereas, the rate of infection severity with isolate Xt10 was 6.4% in wheat seedlings treated with Harpin compared to control which was 43.2%, while in seedlings infected with the isolate Xt4.2 reached (5.2, 39.2)% for seedlings treated with Harpin and water, respectively. Decreased infection severity of the two isolates was associated with a decrease in bacterial growth in the tissues, where the decrease in the bacterial count of the two isolates began 72 hours after infection, and the count was 50 times less in the plants treated with Harpin compared to control for isolate Xt10 and 120 times lower for Xt4.2 isolate. As a result, this study showed the possibility of treating wheat with Harpin protein which is locally produced to increase its immunity and resistance to various pests.



**Cloning the *HrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluating of  
Harpin efficiency in stimulating of some wheat defense response**

**A dissertation submitted in partial fulfillment of the  
requirements for the degree of Ph.D in Agriculture  
Engineering  
(Plant Protection)**

**By**

**Ismaeel Mohammad alsaleh**

**Co-Supervisor**

**Dr. Aroub almasri**

**National commission**

**for Biotechnology**

**Supervisor**

**Prof. Mahmoud Abu-ghorrah**

**Faculty of Agriculture**

**Damascus university**

**2024 -2023م**