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 $Harpin_{Ea}$ مصدره الأساسي بكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة للفحة 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 هلامة 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 عرّض بروتين الهاربين لدرجات حرارة مختلفة (30، 45 ،60، 70، 80) سْ لخمس دقائق، بعدها حقن في أوراق التبغ بعد تبريده لدرجة حرارة الغرفة، وروقبت ردة فعل فرط الحساسية على التبغ، حيث أظهرت النتائج ظهور ردة فعل فرط حساسية على أوراق التبغ مما يدل على الثباتية الحرارية للبروتين.

طبّق 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 سْ لحين إجراء الاختبارات، حيث عزل البروتين الكلي من العينات المحفوظة على شكل خلاصات بروتينية وقدرت تراكيزها بطريقة برادفورد، ومن ثم قيست الفعالية الأنزيمية لأنزيم سوبركسيد دسموتاز Superoxide dismutase (SOD) بواسطة جهاز المطياف الضوئي، وأظهرت النتائج زيادة فعالية أنزيم الـSOD 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 دُرس التعبير المورثي لمورثة zn–SOD ولمورثة الأكتين كشاهد داخلي عن طريق إجراء rt–PCR والرحلان على هلامة الآغاروز، 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 بالهاربين أو المعاملة بالماء، مما يدل بأنّ أنّ لبروتين الهاربين 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 الهاربين المؤشب $Harpin_{Ea}$ في زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز (POD)، وذلك عن طريق قياس الفعالية الأنزيم إعتماداً على طريقتي المطياف الضوئي والرحلان الكهربائي على هلامة متعدد الأكريل أمايد (native-PAGE)، أظهرت نتائج القياس بالمطياف الضوئي زيادة في فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأنسجة النباتية لأوراق القمح المعاملة ببروتين الهاربين مقارنة بالمعاملة بالشاهد (الماء)، كانت الزيادة تدريجية وبلغت أعلى تركيز للأنزيم بعد 72 ساعة بعد معاملة الرش بالهاربين مقارنة بالشاهد حيث بلغت 1.828 ضعف معاملة الشاهد، ثم انخفضت قليلا في الزمن 96 ساعة بعد الرش، وأكد ذلك الكشف عن فعالية أنزيم POD عن طريق إجراء رحلان كهربائي متعدد الأكريل أمايد (Native-PAGE) للخلاصات البروتينية للعينات المدروسة، فبينت نتيجة الرحلان ازدياد كثافة وشدة حزم البيروكسيداز تدريجيا في العينات المعاملة بالهاربين ووصلت لأعلى فعالية (أعلى كثافة وشدة للحزمة الناتجة) في الزمن 72ساعة بعد الرش ثم انخفضت كثافة الحزمة قليلاً في زمن الحصاد 96 سا بعد المعاملة، كما أجريت دراسة للتعبير المورثي لمورثة *GPX* إحدى المورثات المسؤولة عن أنزيم البيروكسيداز وقورنت بتعبير مورثة Taβ-*actin* (الشاهد الداخلي) على هلامة الآغاروز، وأظهرت النتائج ثباتية نسبية في التعبير مع الزمن لكلا المورثتين سواء في بادرات القمح المعاملة بالماء أو البادرات المعاملة ببروتين الهاربين أي لم يظهر تأثير لمعاملة القمح ببروتين الهاربين على التعبير المورثي لمورثة *GPX*، مما يدل على أن تأثير بروتين الهاربين بتحريض انتاج أنزيم البيروكسيداز ليس على مستوى النسخ، وربما هناك مورثات أخرى تلعب دورا في زيادة نشاطه .

كما درس تأثير الهاربين في رفع تركيز الفلافونيدات الكلية بطريقة كلوريد الألمنيوم اللونية، وتبين ازدياد التركيز عند المعاملة بالهاربين حتى بلغ ضعف التركيز تقريباً في معاملة الشاهد عند زمن حصاد 96 سا بعد المعاملة.

كذلك قيم تأثير بروتين الهاربين 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 للهاربين 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 بالهاربين 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 بالهاربين.

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

أظهرت النتائج أنّ 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 *Pethium* 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 للممرض 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 مقارنة بالشاهد للعزلة Xt10 و أقل ب 120 مرة بالنسبة للعزلة Xt4.2 واستمر انخفاض التعداد البكتيري لبعد 99 ساعة من العدوى بالعزلتين الممرضتين Xt10و Xt4.2، وبذلك يكون بروتين الهاربين قد أثبت فعالية في الحد من إمراضية وتخطط الأوراق البكتيري على القمح.

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 $Harpin_{Ea}$ 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* DH5α 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 $Harpin_{Ea}$ 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 72 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 $Harpin_{Ea}$ 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 asignificant 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*, *Pethium*, *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 comparsion 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, respectivel. 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.