الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

تأثير إشارات التواصل البكتيري من عائلة DSF على عوامل الشراسة للبكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* وعلى النبات العائل

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية
(تخصص وقاية النبات)

إعداد المهندس
علي محمد يونس

المشرف
أ.د. محمود أبو غرة
الأستاذ في قسم وقاية النبات
كلية الزراعة–جامعة دمشق

المشرف المشارك
أ.م.د. منال داغستاني
الأستاذ المساعد في قسم الكيمياء
كلية العلوم–جامعة دمشق

2022-2021م
1444-1443هـ

تصريح

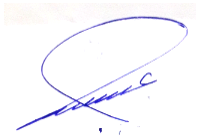
أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الرسالة تحت عنوان:

" تأثير إشارات التواصل البكتيري من عائلة DSF على عوامل الشراسة للبكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* وعلى النبات العائل".

لم يسبق أن قدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وأن كل العمل، والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرف والمشرف المشارك، وجميع المراجع التي ذكرت في هذه الرسالة نسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

المرشح

علي يونس



Declaration

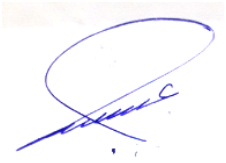
To whom it may concern: I declare that the present work entitled:

"Effect Bacterial Communication Signals of DSF- Family on Virulence Factors of *Xanthomonas citri* subsp. *mlavacearum* and on Host Plant"

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 referrd literature are cited, and well-documented in the list of reference.

Candidate

Ali Younes



شهادة

نشهد بأن هذا البحث الموصوف في هذه الرسالة:

" تأثير إشارات التواصل البكتيري من عائلة DSF على عوامل الشراسة للبكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* وعلى النبات العائل".

هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح علي يونس بإشراف الأستاذ الدكتور محمود أبوغرة من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة دمشق وبمشاركة الأستاذة المساعدة الدكتورة منال داغستاني من قسم الكيمياء في كلية العلوم جامعة دمشق، وأن المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص.

المرشح	المشرف العلمي	المشرف المشارك
م. علي يونس	أ.د. محمود أبو غرة	أ.م.د. منال داغستاني

Certification

It is hereby certified that the work described in this thesis:

"Effect Bacterial Communication Signals of DSF- Family on Virulence Factors of *Xanthomonas citri* subsp. *mlavacearum* and on Host Plant"

It is the result of scientific research done by candidate Ali Yuounes under the supervision of Prof. Mahmoud Abogurra -plant protection department, factually of agriculture, and sub-supervision Manal Daghestani- Chemistry department, factually of Science, and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate	Supervision	Co-supervision
Ali Younes	Pro. Mahmoud Abogurra	Prof. Manal Daghestani

قرار لجنة الحكم

قدمت هذه الأطروحة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية –تخصص وقاية النبات–بجامعة دمشق، وأجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the reguirements for Master Degree in Plant protection, Factualy of Agriculture – Damascus University. Referee committee has approved the thesis.

نوقشت هذه الرسالة في جلسة علنية في كلية الزراعة بجامعة دمشق بتاريخ 2022/8/14م

لجنة الحكم

د. عبد النبي بشير الأستاذ في قسم وقاية النبات –كلية الزراعة –جامعة دمشق–عضواً

د. محمود أبو غرة الأستاذ في قسم وقاية النبات–كلية الزراعة –جامعة دمشق–عضواً مشرفاً

د. غيثاء منصور الأستاذ المساعد في قسم علوم الحياة النباتية–كلية العلوم–جامعة دمشق–عضواً

د. ياسر حماد الأستاذ المساعد في قسم علوم التربة–كلية الزراعة–جامعة تشرين–عضواً

د. إبراهيم العبيد المدرس في قسم وقاية النبات –كلية الزراعة–جامعة تشرين–عضواً

كلمة شكر

كل الشكر والامتنان العميق لمن كان عوناً وداعماً لي في مسيرتي ومن أضاء لي قناديل العلم للوصول إلى هذه المرحلة.

أتقدم في البداية بتوجيه أسمى آيات الاحترام والتقدير إلى أستاذي ومعلمي **الأستاذ الدكتور محمود أبو غرة** لتكرمه لقبول الإشراف على هذه الرسالة وإمدادي بكامل الخبرات العلمية والعملية وصبره وتحمله لكافة الظروف التي مررت بها..... **لك مني كل الحب الاحترام.....**

وكل الشكر **للأستاذة الدكتورة منال داغستاني** التي تكرمت بمشاركتها في الإشراف على هذه الرسالة وتقديم دعمها وتوجيهاتها.

وأتوجه بالشكر والامتنان والتقدير إلى **الأستاذ الدكتور عبد النبي بشير** وإلى **الأستاذ الدكتور زكريا الناصر** اللذين كانا ومازالا عوناً لطلاب الدراسات العليا وتقديمهما التوجيهات البناءة والهادفة لجعل كلية الزراعة من أفضل جامعات القطر.... **لكم مني كل التقدير والامتنان....**

الإهداء

إلى المثل والقدوة.....

إلى الذي ضحى ومازال يضحي بكل ما لديه.....

إلى من يعمل دائما يصمت.....

إلى نبع العطاء الذي لا ينضب .....

إلى من أفتخر به كل الافتخار.....

وإليه أهدي عملي الأول.....

أبي الغالي

إلى القلب الكبير.... ووجه الملاك.....

إلى فيض الحنان.....

به تذهب كل الأحزان وتركع كل النائبات.....

كنت دائماً تسهرين من أجلنا حتى غيابنا.....

إلى من تعجز الكلمات عن وصف عظمتها وروعتها.....

أعز مخلوق إلى قلبي.....

أمي الحبيبة

إلى النجمة المشرقة في سماء عمري.....

إلى عيناي اللتين أبصر بنورهما.....

إلى دفء الروح وخفق الفؤاد.....

إلى رمز المحبة والوفاء.....

زوجتي الحبيبة

إلى القلوب الصافية.....

التي أحاطتني بكل الحب والمودة.....

وقاسمتني البسمة والدمعة.....

لي معكم ذكريات لا تنسى.....

إخوتي الأحباء

الملخص العربي

أجري البحث في كلية الزراعة–جامعة دمشق–مخبر ممرضات النبات البكتيرية، هدف البحث إلى دراسة تأثير كلاً من الإشـارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* S101 (XcmS101) الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على بعض عوامـل الشراسة عند البكتيريا Xcm S101، وتأثيرهما على تطور البكتيريا Xcm S101 والقدرة الإنباتية وردود الفعل الدفاعية في نبات القطن. أظهرت النتائج انخفاضاً في قدرة البكتيريا على النمو والبقاء والحركة وذلك عند المعاملة بالتراكيز المنخفضة منهما (10 µM) من الإشارة النقية للـ DSF، و(0.25 mg\mL) من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مقارنة مع الشاهد، بينما سببت التراكيز العالية µM (50، 100) من الإشارة النقية الـ DSF والتركيز mg\mL (1.25، 7.5) من الخلاصة البكتيرية موت البكتيريا، وتثبيط حركتها. كذلك انخفضت قدرتها على إنتاج البروتياز حيث انخفضت في معاملات mg\mL (0.25، 0.5؛ 1.25) ما يعادل (20، 39، 84) % مقارنة مع الشاهد بعد 120 ساعة من التحضين، وانخفاضاً في إنتاج السكريات المعقدة الخارجية، وتشكل Biofilm حيث سببت التراكيز µM (10، 50) من الإشارة النقية الـ DSF انخفاضاً في تشكل الـ Biofilm ما يعادل (57.5، 76)% مقارنة مع الشاهد، كما سببت الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF انخفاضاً في تشكل الـ Biofilm ما يعادل (31.6، 60، 74)% مقارنة مع الشاهد عند استخدام التراكيز mg\mL (0.25، 0.5، 1.25) على التوالي مقارنة مع الشاهد، كما أظهرت النتائج تحسن إنبات بذور القطن المعاملة بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز µM 100 أو الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز mg\mL (0.25، 0.5) بلغت نسبة الإنبات (91.67، 86.67، 83.33) % على التوالي، بينما بلغ عند الشاهد 73.33%، وبينت النتائج انخفاض الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية لنباتات القطن التي عوملت بذورها بالخلاصة البكتيرية، وانخفاض نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية المُعاملة بطريقة نقع البذور بالتركيز µM 100 من الإشارة النقية الـ DSF أو التركيز 0.5 mg\mL من الخلاصة البكتيرية ما يعادل (0.9، 2.14) لوغاريتمياً مقارنة مع الشاهد بعد 4 أيام من العدوى، بينما بطريقة الحقن انخفضت (2.19، 2.85) لوغاريتمياً مقارنة مع الشاهد، وبينت النتائج تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وتحفيز برنامج الموت الخلوي المبرمج في الأنسجة النباتية للأوراق، وارتفعت مستويات أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلقية المُعاملة إما بطريقة نقع البذور حيث بلغت nanoKatal/mg (85.9، 94.32) عند استخدام التراكيز mg\mL 0.5 من الخلاصة البكتيرية و µM 100 من الإشارة النقية الـ DSF على التوالي بينما وصل عند الشاهد nanoKatal\mg 37.55 أو بطريقة الرش حيث بلغت (104.62، 88.95) على التوالي بينما وصل عند الشاهد (63.22) بعد 48 ساعة من المعاملة.

الكلمات المفتاحية: QS/DSF، عوامل القدرة الإمراضية، تحسن إنبات البذور، ردود الفعل الدفاعية، الشدة المرضية.

فهرس المحتويات Table of Contents

العنوان	الصفحة
- فهرس المحتويات Table of Contents	I
- الاختصارات Abbreviations	III
- فهرس الجداول Tables Index	VI
- فهرس الأشكال Figures Index	VII
- المقدمة Introduction	1
- الإشكالية البحثية Research Problem	3
- تساؤلات البحث Research Questions	3
- فرضيات البحث Research Hypotheses	4
- أهداف البحث Research Objectives	4
- أهمية البحث Research Importance	5
- مبررات البحث Research Justification	5
- محدوديات البحث Research Limits	5
- الفصل الأول: الدراسة المرجعية Literature review	6
1-1-التبقع الزاوي على القطن.	7
1-1-1-الأعراض الظاهرية لمرض التبقع الزاوي على القطن.	8
1-1-2-المكافحة.	9
1-2-الاستشعار عن النصاب العددي Quorum Sensing.	9
1-2-1-أنماط المحرضات الذاتية Autoinducers ووظائفها.	11
1-2-2-الاستشعار عن النصاب العددي عند أنواع الجنس *Xanthomonas*.	13
1-3-خمد الاتصالات البكتيرية-البكتيرية Quorum Quenching.	17
1-4-تشويش العامل الممرض Pathogen Confusion.	18
1-5-الاتصالات البكتيرية-البكتيرية عند البكتيريا Xcm.	18
1-6-تحريض المقاومة في النبات.	19
1-6-1-المقاومة الجهازية المكتسبة Systemic Acquired Resistance.	20
1-6-2-المقاومة الجهازية المستحثة Induced Systemic Resistance.	20
1-7-المقاومة في نبات القطن.	21
1-8-دور المركبات الكيميائية في ردود الفعل الدفاعية في النبات.	22
1-9-دور إشارات الـ Quorum Sensing في ردود الفعل الدفاعية في النبات.	25
1-9-1-إشارات Acyl-Homoserine Lactones.	25
1-9-2-إشارات عائلة Diffusible Signal Factor.	27
- الفصل الثاني: مواد وطرائق العمل Materials and Methods	29
2-1-العزلة البكتيرية وأوساط النمو ومكان تنفيذ العمل.	30
2-2-العدوى الاصطناعية على نبات القطن.	31

2-3-استخلاص إشارات عائلة الـ DSF من وسط زرع البكتيريا Xcm S101.	30
2-4-تحضير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF للتجارب.	31
2-5-تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا Xcm S101:	32
2-5-1-النمو والبقاء.	32
2-5-2-الحركة.	33
2-5-3-إنتاج أنزيم البروتياز.	34
2-5-4-إنتاج السكريات المعقدة الخارجية.	34
2-5-5-تشكل الـ Biofilm.	35
2-6-تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF في النبات العائل:	37
2-6-1-قدرة بذور القطن على الإنبات.	37
2-6-2-الحد من الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية لنبات القطن.	38
2-6-3-الحد من نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية لنبات القطن.	39
2-6-4-تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وبرنامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية لنبات القطن.	40
2-6-5-فعالية أنزيم البيروكسيداز Peroxidase في الأوراق الفلقية.	42
2-7-التحليل الإحصائي.	43
- **الفصل الثالث: النتائج والمناقشة Results and Discussion**	44
3-1-القدرة الإمراضية للعزلة Xcm S101.	45
3-2-التأثير في عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا Xcm S101:	45
3-2-1-النمو البكتيريا والبقاء.	45
3-2-2-الحركة.	51
3-2-3-إنتاج أنزيم البروتياز.	54
3-2-4-إنتاج السكريات المعقدة الخارجية وتشكل الـ Biofilm.	56
3-3-التأثير في النبات العائل:	61
3-3-1-القدرة على إنبات بذور القطن.	61
3-3-2-الحد من الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية لنباتات القطن.	62
3-3-3-الحد من نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية لنباتات القطن.	63
3-3-4-تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وتحفيز برنامج الموت الخلوي المبرمج.	66
3-3-5-فعالية أنزيم البيروكسيداز Peroxidase في الأوراق الفلقية.	68
- **الاستنتاجات Conclusions**	73
- **التوصيات Recommendations**	74
- **قائمة المراجع Bibliography**	75

الاختصارات Abbreviations

المختصر	المصطلح بالانكليزي	المصطلح بالعربي
µM	Micriomolar	ميكرومولار (وحدة تركيز مادة)
3-HBA	3-hydroxybenzoic acid	حمض 3-هيدروكسي بنزويك
4-HBA	4-hydroxybenzoic acid	حمض 4-هيدروكسي بنزويك
AA	Arachidonic acid	حمض الأراشيدونيك
Acyl-ACP	Acyl- acyl carrier protein	الأسيل الحامل للبروتين
AHL	Acyl Homoserine Lactone	أسيل هومو سيرين لاكتون
AIP	Autoinducer Piptides	ببتيدات التحريض الذاتي
ASM	Acibenzolar-S-methyl	أسيبنزولار-S-ميثيل
ASM	Acibenzolar-S-methyl	أسيبينزولار-S-ميثيل
avr	Avirulence gene	مورثات عدم شراسة
BDSF	Cis-2-dodecenoic acid	حمض Cis-2-دوديسينويك
CDSF	Cis-11-methyldodeca-2,5-dienoic acid	حمض Cis-11-ميثيل دوديكا-2،5-دينويك
CFU	Colony Forming Unit	وحدة (خلية) مُشكلة لمستعمرة
DAMPS	Damage-Associated Molecular Patterns	الأنماط الجزيئية المرتبطة بالضرر
DF	Diffusible Factor	العامل المنتشر
DHA	Docosahexaenoic acid	حمض دوكوساهيكسانويك
DSF	Diffusible Signal Factor	عامل الإشارة المنتشر
DSF	Cis-2-methyl-11-dodecenoic acid	حمض Cis-2-ميثيل-11- دوديسينويك
EPA	Eicosa pentaenoic acid	حمض إيكوسابينتانويك
EPS	Exopolysaccharides	السكريات المعقدة الخارجية
HAMPS	Herbovores-Associated Molecular Patterns	الأنماط الجزيئية المرتبطة بآكلة الأعشاب
HR	Hypersensitive Reaction	فرط الحساسية

IDSF	Cis-10-methyl-dodecenoic acid	حمض Cis-ميثيل- دوديسينويك
ISR	Induced Systemic Resistance	المقاومة الجهازية المستحثة
LOX	Lipoxygenase	أنزيم ليبوكسيجيناز
LPS	Lipopolysaccharides	عديدات السكر الليبيدية
MAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns	الأنماط الجزيئية المرتبطة بالميكروب
MAPK-3	Mitogen-activated protein Kinase-3	الميتوجين-المُنشَط ببروتين الكيناز-3
MBC	Minimal Bactericidal Concentration	التركيز الأدنى القاتل للبكتيريا
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	التركيز الأدنى المثبط لنمو البكتيريا
NA	Nutrient Agar	الآغار المغذي
NB	Nutrient Broth	المرق المغذي
OD	Optical Density	الكثافة الضوئية
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns	الأنماط الجزيئية المرتبطة بالعامل الممرض
POD	Peroxidase	البيروكسيداز
PR-1	Protein related-1	البروتين المرتبط بالعامل الممرض
PRPs	Pattern Recognition Receptor	مستقبلات التعرف على الأنماط الجزيئية
QQ	Quorum Quenching	خمد الاستشعار عن الكثافة العددية
QS	Quorum Sensing	الاستشعار عن الكثافة العددية
RF	Retention Factor	عامل الاحتفاظ
ROS	Reactive Oxygen Species	أشكال الأوكسجين الفعال
rpf	Regulation of Pathogenicity Factors	عوامل تنظيم القدرة الإمراضية
SA	Salicylic acid	حمض الصفصاف
SAR	Systemic acquired resistance	المقاومة الجهازية المكتسبة
SOD	Superoxidase Dismutase	سوبرأوكسيد ديسموتاز
TMV	Tobacco mosaic virus	فيروس موزاييك التبغ

الأنماط الجزيئية المرتبطة بالفيروس	Viral-Associated Molecular Patterns	**VAMPS**
بكتيريا تبقع أوراق الحمضيات	*Xanthomonas citri* pv. *axanapodis*	**Xac**
بكتيريا عفن الصليبيات	*Xanthomonas campestris* pv. *Campstris*	**Xcc**
بكتيريا التبقع الزاوي على القطن ذي السلالة S101	*Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* S101	**Xcm S101**
البكتريا المسببة لمرض بيريس	*Xylella fastidiosa*	**Xf**
1xg تشـــير إلى الســـرعة المرتبطة بالجاذبية (98 m/s)	1xg correspond to normal acceleration due to gravity (98 (m/s	**Xg**
بكتيريا التخطط البكتيري على الرز	*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*	**Xoc**
بكتيريا اللفحة البكتيرية على الرز	*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*	**Xoo**

فهرس الجداول List of Tables

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1	تأثير إشارات عائلة الـ DSF على الوظائف الحيوية عند البكتيريا المنتجة لها.	14
2	إشارات عائلة الـ DSF عند البكتيريا Xcm S101.	19
3	الأنماط الجزيئية المختلفة لـ MAMPs، DAMPs.	24
4	أهم التأثيرات التي تحدثها إشارات AHLs على الأنواع النباتية المختلفة.	28

فهرس الأشكال List of Figures

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1	**A**: المستعمرات البكتيرية، **B**: شكل الخلية تحت المجهر.	7
2	أهم أعراض الإصابة بمرض التبقع الزاوي على الأجزاء المختلفة لنبات القطن.	9
3	ألية عمل الـ QS.	10
4	أهم أنواع إشارات QS البكتيرية وتركيبها الكيميائي.	12
5	الوظائف البيولوجية الخاضعة لسيطرة نظام الـ QS.	12
6	الصيغة الكيميائية لجزيئتي عائلة DF.	13
7	عامل الإشارة المنتشر الـ DSF ومشتقاته في الأنواع البكتيرية المختلفة.	14
8	توزع مورثات *Rpf* المنظمة لعوامل الشراسة.	15
9	الأحداث المرافقة لفرط الحساسية عند نبات القطن ضد البكتيريا Xcm.	22
10	ألية عمل جزيئات PAMPs، DAMPs، MAMPs.	23
11	ألية تأثير إشارات AHLs على مقاومة النبات.	25
12	أعراض البقع الزيتية المائية Watersoaking الناتجة عن الإصابة بالعزلة Xcm S101.	46
13	تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا على: (A): البقاء في الوسط الفقير، (B) النمو في الوسط المغذي.	50
14	تأثير الإشارة النقية الـ DSF مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد (ماء مقطر) على قدرة البكتيريا Xcm S101: (A) في الوسط المغذي، (B) البقاء في الوسط الفقير.	51
15	تأثير إضافة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائل الـ DSF إلى وسط الحركة شبه الصلب (NB+ 0.3% Agar) على حركة البكتيريا Xcm S101.	53
16	تأثير إضافة الإشارة النقية الـ DSF إلى وسط الحركة شبه الصلب (NB+ 0.3% Agar) مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، والشاهد على حركة البكتيريا Xcm S101.	54
17	تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا Xcm S101 على إنتاج البروتياز.	56
18	تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا Xcm S101 على إنتاج الـ EPS؛ A–في البيئة NB، B–في البيئة XLON.	58
19	تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تشكل Biofilm.	60

20	تأثير الإشارة النقية الـ DSF مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد على تشكل Biofilm.	61
21	تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة بذور القطن صنف حلب 33 على الإنبات.	62
22	تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الحد من شدة المرض في الأوراق الحقيقية المعاملة بذورها بطريقة النقع، حيث انخفضت الشدة المرضية كلما زاد تركيز الخلاصة (طريقة حقن الأوراق بالمعلق البكتيري).	63
23	تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الحد من شدة المرض في الأوراق الحقيقية المعاملة بذورها بطريقة النقع، حيث انخفضت الشدة المرضية كلما زاد تركيز الخلاصة (طريقة رش الأوراق بالمعلق البكتيري).	64
24	الكثافة البكتيرية لـ Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية المعاملة مسبقاً بطريقة نقع البذور بالإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مقارنة مع الشاهد.	65
25	الكثافة البكتيرية Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية بعد 24 ساعة من الحقن بالإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF.	66
26	الكثافة البكتيرية Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية المعاملة مسبقاً بطريقة الحقن بمعلق حاوي على الإشارة النقية الـ DSF مع البكتيريا Xcm S101 أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مقارنة مع الشاهد.	67
27	تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين في الأوراق الفلقية لنبات القطن بعمر 10 أيام.	68
28	تحفز برنامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية لنبات القطن بعمر 10 أيام.	69
29	معادلة الخط البياتي لتركيز بروتين مصل البقر.	70
30	زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلقية لنبات القطن بعمر 10 أيام المعاملة بطريقة نقع البذور.	70
31	زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلقية لنبات القطن المعاملة بطريقة الرش مروراً مع الزمن.	71

المقدمة Introduction

يسهم القطاع الزراعي السوري مساهمة كبيرة في الاقتصاد الوطني فهو يؤمن فرص عمل لنحو 50% من القوة العاملة السورية. إضافة إلى تأمينه الغذاء والكساء والمادة الأولية للصناعات التحويلية الوطنية، ويخفف من عجز الميزان التجاري. ويعد القطن من أهم المحاصيل الاستراتيجية في سوريا، حيث يوفر المادة الخام لصناعات الغزل والنسيج والزيوت والصناعات الطبية، والعديد من فرص العمل في مجال زراعة وصناعة القطن، وبلغت المساحة المزروعة لنبات القطن في سوريا عام 2020 ما يقارب 33 ألف هكتار، وبإنتاج 98 طن/ هكتار، وتتميز الأقطان السورية بنظافتها من المواد الكيميائية والشوائب، نتيجة الاتجاه نحو استخدام المكافحة الحيوية لإنتاج القطن العضوي وقطفها يدوياً (وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي–المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية 2020).

يُصاب محصول القطن بالعديد من الآفات الحشرية والمسببات المرضية التي تسبب له تدهوراً في الإنتاج وانخفاضاً في قيمته الاقتصادية، ومن أخطر الممرضات التي تصيب محصول القطن مرض التبقع الزاوي *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm)، الذي يصيب معظم أجزاء نبات القطن، مسبباً له خسائر اقتصادية كبيرة كمّاً ونوعاً (Thiessen وKoenning، 2017).

يتحكم بتعبير عوامل القدرة الإمراضية لبكتيريا الجنس *Xanthomonas* نظام الاتصالات البكتيرية–البكتيرية Quorum Sensing (QS) الذي يتوسطها إشارات عائلة عامل الإشارة المنتشر DSF (Diffusible Signal Factor–family)، ويتحكم نظام QS بتعبير المورثات المسؤولة عن شراسة البكتيريا استجابة لكثافتها العددية في الوسط (Wang وآخرون، 2004). وعُدَت الخلايا البكتيرية لسنوات عديدة في المقام الأول أفراداً مستقلة تعيش بعزلة عن بعضها البعض، ولكنه في الآونة الأخيرة، أصبح من الواضح أنها تعمل بعيداً عن العزلة، وتنسق سلوكها جماعياً استجابة للتحديات البيئية باستخدام شبكة من الاتصالات المعقدة بين الخلايا البكتيرية، وتتوسط تلك الاتصالات جزيئات كيميائية صغيرة الحجم تسمى بالمحرضات (المحفزات) الذاتية (Autoinducers)، التي تؤدي إلى تغييرات في التعبير الجيني استجابة للكثافة العددية البكتيرية، هذه العملية يُشار إليها عادة باسم الاستشعار عن النصاب العددي Quorum Sensing (QS)، ويتحكم هذا النظام بتنظيم تعبير مجموعة من المورثات المسؤولة عن القدرة

الإمراضـــية والضـــرورية للخلايا البكتيرية لاســـتعمار العائل المضـــيف، مثل نمو الخلايا، الحركة وتشـــكل البيوفيلم (Biofilm) والأنزيمـات المحللـة للجـدر الخلويـة كـالبروتيـاز والســـيللولاز، وغيرهـا من عوامـل القـدرة الإمراضـــيـة (Papenfort و Bassler، 2016؛ Deng وآخرون، 2011، Caicedo وآخرون، 2017).

ومن هذه المحرضـات الذاتية عائلة عامل الإشـارة المنتشـر Diffusible Signal Factor-family (DSF-family) التي تتوسط الـــ QS عند طيف من الأنواع البكتيرية سالبة الغرام منها الجنس *Xanthomonas* والتي تنظم تعبير مورثات القدرة الإمراضية عندها، واكتشفت لأول مرة من قبل Barber وآخرين (1997).

إن التدخل بعمل إشارات التواصل البكتيري من خـلال خمد الاتصـالات البكتيرية (Quorum Quenching)، (QQ) أي تعطيل عمل الإشارات التي تتوسط الـــ QS بواسطة أنزيمات مفككة للإشارات أو التأثير على مستقبلات الإشارة الموجودة على سطح الخلية البكتيرية أو الإفراط في تركيز إشـــارات الـ QS (Over production) في وسط نمو البكتيريا ما يجعلها في حالة تشـوش Pathogen Confusion، ينتج عنهما انخفاض القدرة الإمراضـية للبكتيريا وانخفاض الشدة المرضية ضـمن العائل النباتي (Caicedo وآخرون، 2017).

ومن ناحية أخرى، تؤثر إشارات التواصل البكتيري التي تتوسط الـــ QS تأثيراً مهماً في تنظيم التفاعلات بين النبات والبكتيريا المرتبطة بها (Li وآخرون، 2019؛ Zhou وآخرون، 2016؛ Lonescu وآخرون، 2013؛ Ryan وآخرون، 2015؛ Fouhy وآخرون، 2007؛ Torres وآخرون، 2007؛ Vojnov وآخرون، 2009)، حظيت هذه الآليات باهتمام كبير من قبل العلماء، بسبب التأثيرات المختلفة لجزيئات الـــ QS المختلفة على النباتات، يتراوح هذا التأثير من تعزيز النمو إلى المقاومة المســـتحثة، أو التأثير على مقاومة النبات وإضـــعافها لأجل البكتيريا (Kakkar وآخرون، 2015؛ Dow، 2016).

ينقسـم هذا البحث إلى ثلاثة فصـول؛ فيتضـمن الفصـل الأول الدراسـة المرجعية لأهم الأبحاث المنشـورة في مجال نظام الـــ QS عند عدد من الأنواع البكتيرية عامة وعند الجنس *Xanthomonas* خاصة، وتأثير إشارات عائلة الـــ DSF على البكتيريا المنتجة لها، وعلى النبات العائل. أما الفصل الثاني فيتضمن مواد البحث وطرائقه: فيتضمن طريقة استخلاص إشارات عائلة الـDSF من وسط نمو البكتيريا Xcm S101، وتحضيرها مع الإشارة النقية الـ DSF

(Sigma90%≤) لأجل إجراء الدراســـات بواســـطتها على البكتيريا؛ من خلال دراســـة تأثير التراكيز المختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـــ DSF أو الإشارة النقية الـــ DSF على نمو البكتيريا وبقائها وحركتها وإنتاجها للسكريات المعقدة الخارجية والبروتياز وتشـــكلها لـ Biofilm مخبرياً، وتأثيرهما على تطور البكتيريا Xcm S101 ضـــمن الأنســـجة النباتية لنبات القطن، وعلى ردود الفعل الدفاعية في النبات كقياس فعالية أنزيم البيروكسـيداز، وتراكم بيروكسـيد الهيدروجين والموت الخلوي المبرمج. أما الفصـل الثالث فيتضـمن نتائج التجارب المذكورة سـابقاً مع التفسـير العلمي لها، كما يتضـمن عرضـاً للتحليل الإحصـائي لنتائج البحث، وأيضـاً أهم الاستنتاجات والتوصيات المقترحة.

الإشكالية البحثية Research Problem

تكمن الإشكالية البحثية في الأضرار والخســـائر الاقتصاديـــة التي تسببها البكتيريا Xcm على محصـول القطن في سوريا، والإجراءات الزراعية المختلفة التي ساعدت على انتشاره إلى مختلف المناطق المزروعة بالقطن كالري الرذاذي، وعدم استخدام الأصناف المقاومة، والحاجة إلى إيجاد طرائق أكثر فعالية في مكافحة بكتيريا التبقع الزاوي على القطن، وآمنة للإنسان والحيوان والبيئة ومنها استهداف نظام الاستشعار عن النصاب العددي (QS) عند البكتيريا Xcm، وافتقار الدراسات المرجعية المحلية السابقة لدراسة تأثير إشارات عائلة الـDSF التي تتوسط نظام الـ QS عند هذه البكتيريا في عوامل الشراسة، وفي ردود الفعل الدفاعية عند نبات القطن.

تساؤلات البحث Research Questions

1- هل لإشارات عائلة الـ DSF القدرة على التحكم بعوامل القدرة الإمراضية عند البكتيريا Xcm S101 كالنمو والحركة وتشكل Biofilm وإنتاج السكريات المعقدة الخارجية والبروتياز الضرورية لاستعمار النسيج النباتي؟

2- هل لإشارات عائلة الـ DSF تأثير على القدرة الإنباتية لبذور القطن؟

3- هل تؤدي معاملة بذور القطن بإشارات عائلة الـ DSF إلى الحد من الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101؟

4- هل يمكن استخدم إشارات عائلة الـ DSF كعامل مكافحة بيولوجية ضد البكتيريا Xcm S101 المُنتجة لها بطريقة التشويش على العامل الممرض Pathogen Confusion عن طريق التحكم في مزامنة التعبير عن عوامل القدرة الإمراضية، والحد من تطوره من خلال معاملة نبات القطن بها؟

5- هل لإشارات عائلة الـ DSF أثر في تحريض ردود الفعل الدفاعية عند نبات القطن كالمقاومة الجهازية المكتسبة، والمقاومة الموضعية المكتسبة، وتراكم بيروكسيد الهيدروجين، والموت الخلوي المبرمج، وزيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز؟

فرضيات البحث Research Hypotheses

1- تأثير الإشـــارة النقية الـ DSF أو خلاصة وســـط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا Xcm S101 كالنمو والبقاء والحركة، وإنتاج البروتياز، وإنتاج السكريات المعقدة الخارجية، وتشكل الـ Biofilm.

2- تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشـــارات عائلة الـ DSF في النبات العائل (القطن): كالقدرة الإنباتية لبذور القطن، والحد من الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية، والحد من نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية، وتحفيز ردود الفعل الدفاعية كتراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين، وتحفيز برنامج الموت الخلوي المبرمج، وزيادة نشاط فعالية أنزيم البيروكسيداز في النباتات المعاملة بهما.

أهداف البحث Research Objectives

هدف البحث إلى دراسة تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF: **1**- في بعض عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا Xcm S101 مخبرياً كالنمو والبقاء والحركة وإنتاج السكريات المعقدة الخارجية والبروتياز، وتشكل البيوفيلم Biofilm، **2**- في النبات العائل كإنبات بذور القطن، والحـد من الشدة المرضية وتطور نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية والفلقية لنباتات المعاملة

بهما، وفي ردود الفعل الدفاعية عند نبات القطن كتراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وتحفيز برنامج الموت الخلوي المبرمج وزيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز.

أهمية البحث Research Importance

تكمن أهمية البحث انطلاقاً من أهمية دراسة الاستشعار عن النصاب العددي QS عند البكتيريا، وتحكمها في تنسيق التعبير عن عوامـل قدرتها الإمراضيـة عند بكتيريا التبقع الزاوي Xcm، ومن جهة ثانية تكافح مرض التبقع الزاوي على القطن Xcm مستخدماً أدوات الممرض نفسه لاستعمار النسيج النباتي، وأنه استخدم إشارات عائلة الـ DSF والمعزولة من البكتيريا Xcm في تحسين القدرة الإنباتية لبذور القطن، وتحسين ردود الفعل الدفاعية عنده.

مبررات البحث Research Justifications

تعود المبررات البحثية إلى صـعوبة مكافحة مرض التبقع الزاوي على القطن Xcm بالطرائق التقليدية المتبعـة، ما دفع إلى البحث عن طريقة بديلة فعالة لمكافحة بكتيريا مرض التبقع الزاوي تعتمد على استهداف نظام التواصل البكتيري الـ QS عندها والمسؤول عن تنظيم تعبير المورثات المسؤولة عن عوامل الشراسة لديها وذلك من خلال التدخل في عمل إشارات عائلة الـ DSF التي تتوسط الـ QS عندها من خلال رفع تركيزها في وسط نمو البكتيريا فتصبح في حالة تشوش Pathogen Confusion، ينتج عنها انخفاض القدرة الإمراضية للعامل الممرض.

محدوديات البحث Research Limits

لم يتطرق البحث إلى:

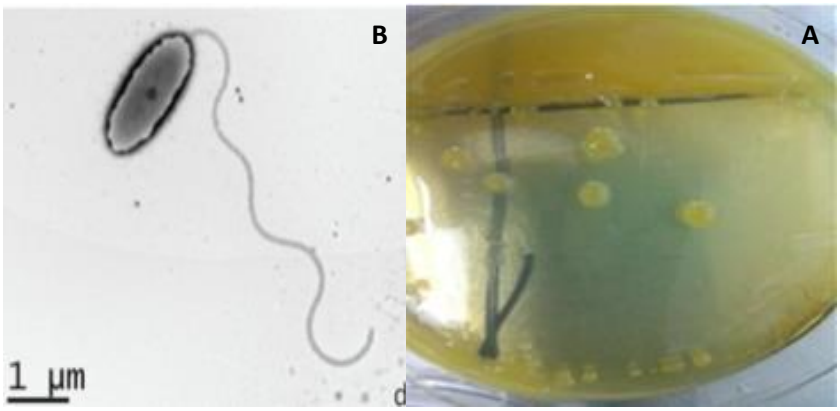
تنقية إشارات عائلة الـ DSF من خلاصة وسط الزرع البكتيري، وحساب أكثر الإشارات وجوداً في الخلاصة، كما لم يتطرق البحث إلى دراسة تأثير كل إشارة على حدة على عوامل الشراسة عند البكتيريا Xcm S101، وتأثيرها على نبات القطن.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية Literature review

1-1-التبقع الزاوي على القطن:

أُكتشـــفت بكتيريا مرض التبقع الزاوي على القطن لأول مرة على يد العالم Smith (1901) وســـميت بـ *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*، ثم أُطلق عليها أسـماء مختلفة بناء على صفاتها المختلفة، فعُرفت سـابقاً باســـــم *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* اعتماداً على الصـفات الفيزيولوجية والبيوكيميائية والصـــفة التخصـــصـــية للعائل (Dye وآخرون، 1980)، ومع تقدم تقانات البيولوجيا الجزيئية وتحديد التتابع النيكليوتيدات في جينوم أنواع متعددة تابعة للجنس *Xanthomonas* ومن بينها هذه البكتيريا، صُـــنّفت تحت نوع *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*، والتي تُتبع لعـائلـة *Xanthomonadacea* ورتبـة *Xanthomonadales* وصـف Gammaproteobacteria (Oliveira وآخرون، 2011؛ Schaad وآخرون، 2006). وتتميز هذه البكتيريا، بأنها ســـالبة الغرام، عصـــوية الشـــكل، هوائية التنفس، متحركة بســـوط واحد قطبي، ســـالبة الأوكسـيداز، موجبة الكاتالاز (Hayward، 1964)، المسـتعمرات البكتيرية مخاطية الشـكل محدبة ذات حواف ناعمة، (الشـــكل 1) كما تفرز البكتيريا أصـــبغة صـــفراء غير منحلة في الوســـط الغذائي الغني بالغلوكوز تُســـمى Xanthmonadin، وكميات كبيرة من الســـكريات المعقدة الخارجية Exopolysaccarides (EPS)، درجة الحرارة المثلى لنموها 25-30°C، وتمتلك طور Epiphytic على ســـطح الأنســـجة النباتية العائل وغير العائل (Schaad وآخرون، 2001)، تقوم البكتيريا Xcm لإنجاح احتلالها واستعمارها لسطح نبات القطن والدخول إلى الفراغات بين الخلوية بإنتاج مجموعة من عوامل الشراسة كإفرازها للأنزيمات المحللة للجدر الخلوية كـــ Cellulase وPectinase وLipase وProtease وAmylase وإنتاجها لـ EPS وعديدات السكر الليبيدية LPS (Gabriel وآخرون، 1989).

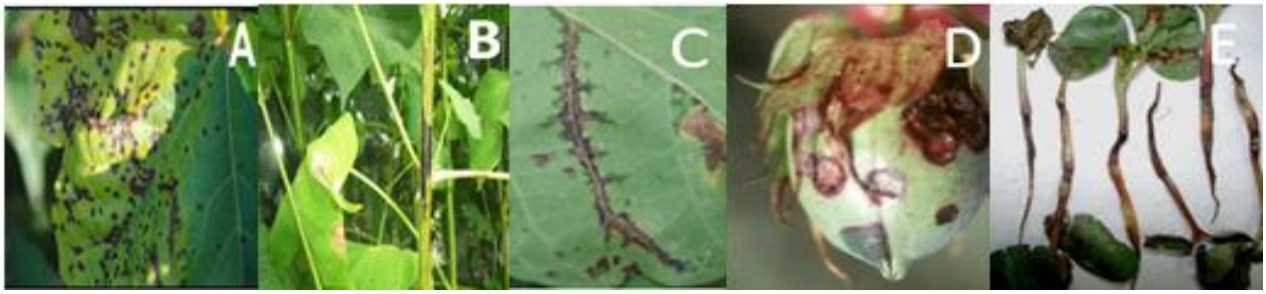


الشكل (1): A: المستعمرات البكتيرية، B: شكل الخلية البكتيرية تحت المجهر.

الدراسة المرجعية

1-1-1-الأعراض الظاهرية للتبقع الزاوي على القطن:

يمكن أن يُصـــاب نبات القطن بمرض التبقع الزاوي على القطن من مرحلة النباتات الفتية، وفي كل مراحل تطوره، حيث يسمى المرض حسب المكان الذي يصيبه (الشكل 2)، ويمكن أن نميز أربعة أنواع من الأعراض: لفحة البادرات، والتبقع الزاوي، ولفحة الأعصـــاب، وعفن الجوزات، والذراع الأســـود (Thiessen وKoenning، 2017)، ويظهر المرض في مرحلة الأوراق الفلقية على شكل بقع مائية مستديرة ذات مظهر زيتي على السطح السفلي للأوراق ومع اشـــتداد المرض يتســـبب ذلك في احتراق البادرات وموتها فيما يعرف هذا العرض **بلفحة البادرات**، تكون هذه البكتيريا متموضـــعة داخل البذور أو على ســطحه. أما على الأوراق الحقيقية فتظهر على شــكل بقع مزواة زيتية مائية على السطح السفلي للأوراق، ومع تقدم الإصابة تؤدي إلى اصفرار الأوراق وسقوطها فيما يعرف العرض باسم **التبقع الزاوي**، أما أعصـاب الأوراق فتتلون باللون الأسـود وكأنها تعرضـت للاحتراق لذلك سـمَي هذا العرض **بلفحة أعصـاب الأوراق**، ومن أخطر الأعراض التي تحدثها تقرحات سوداء اللون على الساق، وتؤدي إلى تكسر النبات وسقوطه عند تعرضـــه لرياح قوية، ويعرف العرض باســم **الذراع الأســـود**، ومن الأعراض التي تســببها البكتيريا على القطن محدثة ضـرراً اقتصـادياً هو **عفن الجوزات** ويظهر على الغلاف الثمري للجوزات بقع زيتية مشبعة بالماء دائرية الشكل تصبح فيما بعد بنية إلى سوداء اللون وقد تتشقق. تؤدي إصابة الجوزات إلى تلون الألياف باللون الأصفر الناتج عن إفراز الـ Xanthomandin وتلوث البذور بالبكتيريا وتصـــبح مصـــدراً للعدوى، كما تتعرض الجوزات لإصـــابات ثانوية بأعفان أخرى مثل .sp *Aspergillus* مؤديا إلى تلون الألياف باللون الأســود وتلفها (Jalloul وآخرون، 2015). ترتبط هذه الأعراض بعدة عوامل أهمها: طور نمو النبات ومرحلة النمو البكتيري والظروف البيئية الســـائدة من حرارة ورطوبة قبل حدوث الإصابة وبعدها، وكذلك مقاومـــة النبات (Metha وآخرون، 2005؛ Jalloul وآخرون، 2015). يُعرف حتى الآن 22 سلالة مرضية لهذه البكتيريا (Jalloul وآخرون، 2015)، فبعضـها يصـيب جميع أصـناف القطن المزروعة مثل السـلالة 20، وبعضـها الآخر يُصـيب بعض الأصـناف، بينما تبدي الأصـناف المقاومة أعراض فرط الحسـاسـية Hypersensitive response على شـــكل بقع متماوتة في أماكن دخول البكتيريا وتكون غير مرئية بالعين المجردة وهذه المقاومة فعَالة في الحد من تطور المرض (Allen وWest، 1991).



الشكل (2): أهم أعراض الإصابة بمرض التبقع الزاوي على الأجزاء المختلفة لنبات القطن. (A) تبقع زاوي على الأوراق، (B) الذراع الأسود على الساق، (C) لفحة أعصاب الأوراق، (D) عفن الجوز، (E) لفحة البادرات (يونس وآخرون، 2018)

1-1-2-المكافحة:

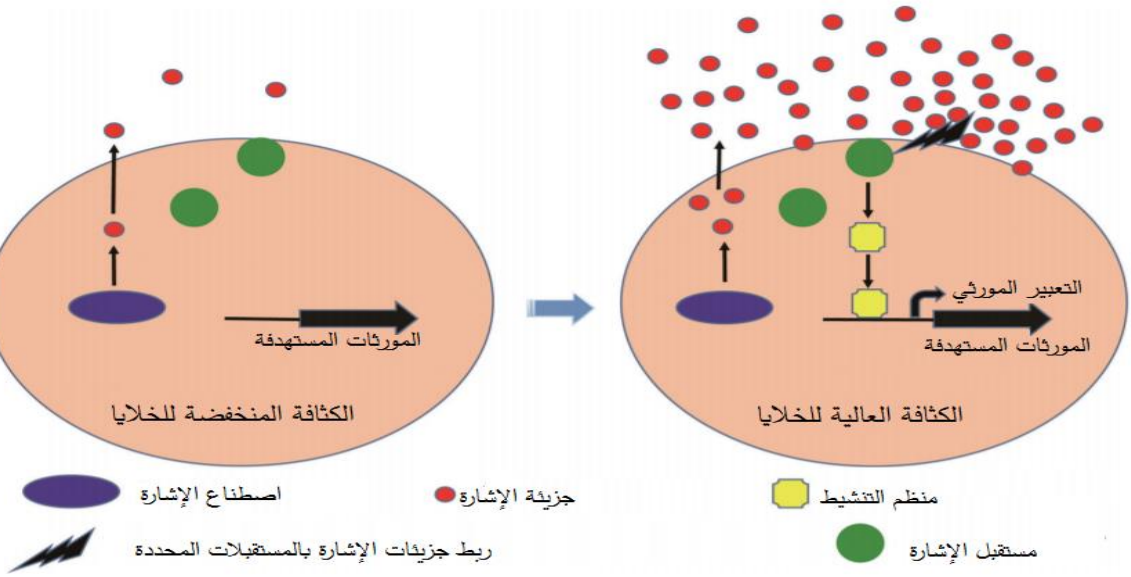
إن الإجراءات المتبعة في مكافحة المرض هي وقائية بسبب غياب المبيدات الكيميائية المتخصصة لمكافحة البكتيريا، وتعتمد على الطرائق الزراعية مثل موعد الزراعة واتباع دورة زراعية والري (تجنب الري الرذاذي) والصرف المناسبين والتخلص من مخلفات المحصول السابق (Bayles و Verhalen، 2007)، وتعقيم البذور المعدة للزراعة إما من خلال التعقيم السطحي بالمركبات النحاسية أو بإجراء حلاقة كيميائية بواسطة حمض الكبريت التجاري للتخلص من الحمولة البكتيرية على سطح البذور، أيضاً زراعة الأصناف المقاومة للمرض (Delannoy وآخرون 2005)، أو استخدام مركبات كيميائية تساعد على تحريض المقاومة في نبات القطن للحد من انتشار البكتيريا Xcm وغيرها من الممرضات التي تصيب محصول القطن منها؛ حمض الصفصاف، فوسفات البوتاسيوم الحمضية والقلوية، حمض الستريك، وحمض البنزويك (Atiq وآخرون، 2017).

ومن الطرائق الحديثة في مكافحة أمراض النبات البكتيرية استهداف نظام الاتصالات البكتيرية-البكتيرية Quorum Sensing (QS) المسؤولة عن تنظيم تعبير مورثات الشراسة الضرورية لاستعمار النسيج النباتي، وذلك إما من خلال خمد الاتصالات البكتيرية Quorum Quenching (QQ) أو تشويش العامل الممرض Pathogen Confusion من خلال زيادة تركيز إشارات الـ QS في وسط نمو البكتيريا (Caicedo وآخرون، 2017).

1-2-الاستشعار عن النصاب العددي Quorum Sensing:

يُعد نظام الاتصالات البكتيرية-البكتيرية (QS) سمة مميزة تمكن الخلايا البكتيرية من التواصل مع بعضها البعض مثل الكائنات متعددة الخلايا لتنسيق التعبير عن مجموعة من عوامل القدرة الإمراضية استجابة لكثافتها

العددية في الوسط، كاستعمار العوائل المختلفة، والتكيف مع التغييرات البيئية، ومقاومة دفاعات المضيف، وتقوية القدرة التنافسية، والاستفادة من المصادر الغذائية الجديدة، حيث تعتمد موهبة السلوك التعاوني للخلايا البكتيرية على التعرف على جزيئات الإشارة من خلال نظام يسمى بالاستشعار عن النصاب العددي QS (Baltenneck وآخرون، 2021)، تُعد الـQS من الناحية الوظيفية، آلية ترجمة إشارات كيميائية صغيرة الحجم تسمى بالمحرضات الذاتية (Autoinducers) التي تتوسط الـ QS لتنسيق التعبير عن المورثات على مستوى المجتمع البكتيري، تعتمد الـ QS على إنتاج المحرضات الذاتية التي تسمى أيضاً جزيئات الإشارة، وإطلاقها والاستجابة لها بطريقة تعتمد على الكثافة العددية (الشكل 3)، فعند الكثافة المنخفضة للخلايا البكتيرية، تنتج كل خلية بكتيرية المستوى الأساسي من جزيئات الإشارة، وتنتشر هذه الجزيئات في الوسط التي تعيش فيه البكتيريا، ومع زيادة الكثافة العددية للخلايا البكتيرية تتراكم جزيئات الإشارة حتى تصل إلى المستوى المطلوب لاستحثاث نظام الـ QS، وبناء عليها يتم تنشيط التعبير أو قمعه عن المورثات المستهدفة (Waters و Bassler، 2005؛ Caicedo وآخرون، 2017؛ Schmid وآخرون، 2012). أُكتشف نظام الـ QS لأول مرة عند البكتيريا البحرية المضيئة *Vibrio fischneri*، حيث وُجد أن جزئية Acyl–homoserine lactone (AHL) تتوسط الـ QS عندها (Bainton وآخرون، 1992)، ثم اكتشفت عند جميع الأنواع البكتيرية سالبة الغرام وموجبة الغرام (Waters و Bassler، 2005).



الشكل (3): أليه عمل الـ QS، بعد أن تفرز كل خلية المحرض الذاتي، يصل تركيز الإشارات البكتيرية (المحرضات الذاتية) إلى عتبة معينة تعمل على حث الـ QS حيث تستقبلها مستقبلات تعمل على تنشيط البروتين المرتبط بالمورثة المطلوب تنظيم عملها (Li وآخرون، 2019).

الدراسة المرجعية

1-2-1-أنماط المحرضات الذاتية Autoinducers ووظائفها:

تتميز المحرضات الذاتية (الشكل 4) عن بعضها باختلاف طبيعتها الكيميائية حسب نوع البكتيريا المفرزة لها وبطريقة إفرازها إلى الوسط الخارجي واستقبالها منه (Deng وآخرون، 2011)، وقُسمت إلى:

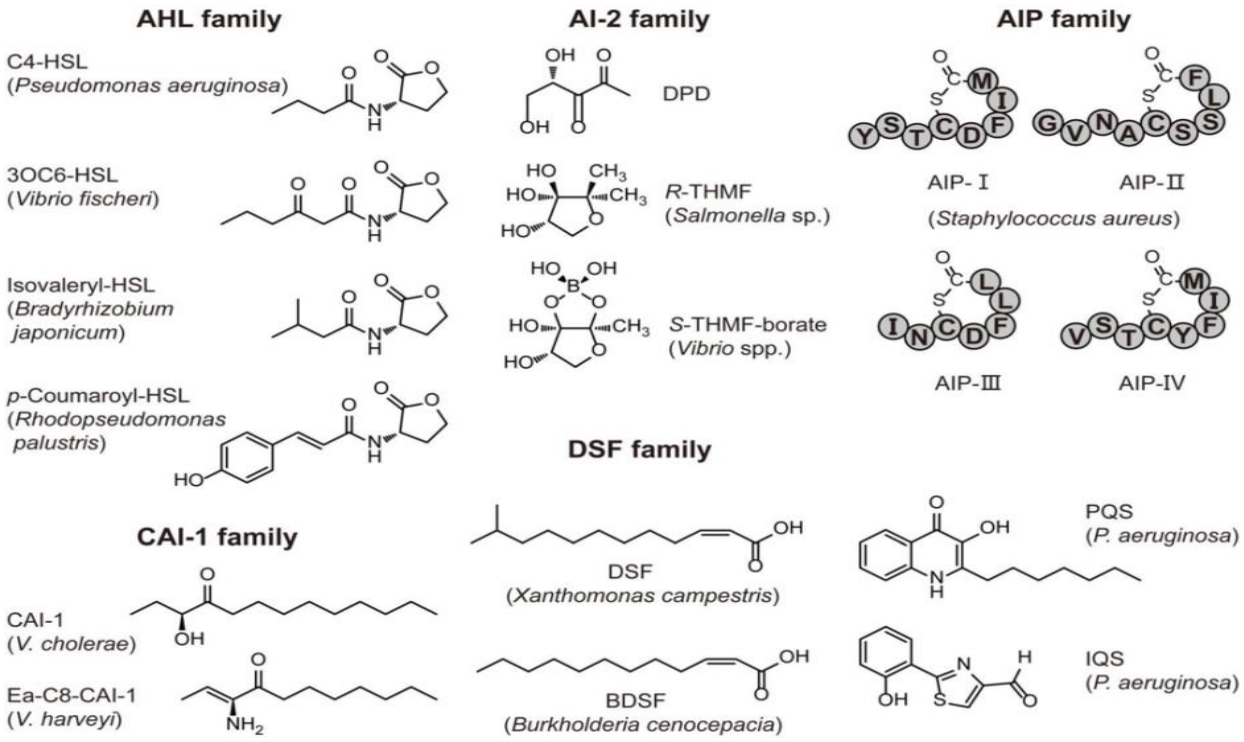
A- المحرضات الذاتية ذات الطبيعة الببتيدية (Autoinducer peptides) التي تتوسط الـــ QS عند أنواع البكتيريا موجبة غرام (Fredrick وآخرون، 2017).

B- الأسيل هوموسيرين لاكتون N-acyl-homosreine lactone (AHLs) الذي يتوســـط الـ QS عند أنواع البكتيريا سالبة غرام ماعدا أنواع جنس *Xanthomonas* (Jayraman و Wood، 2008).

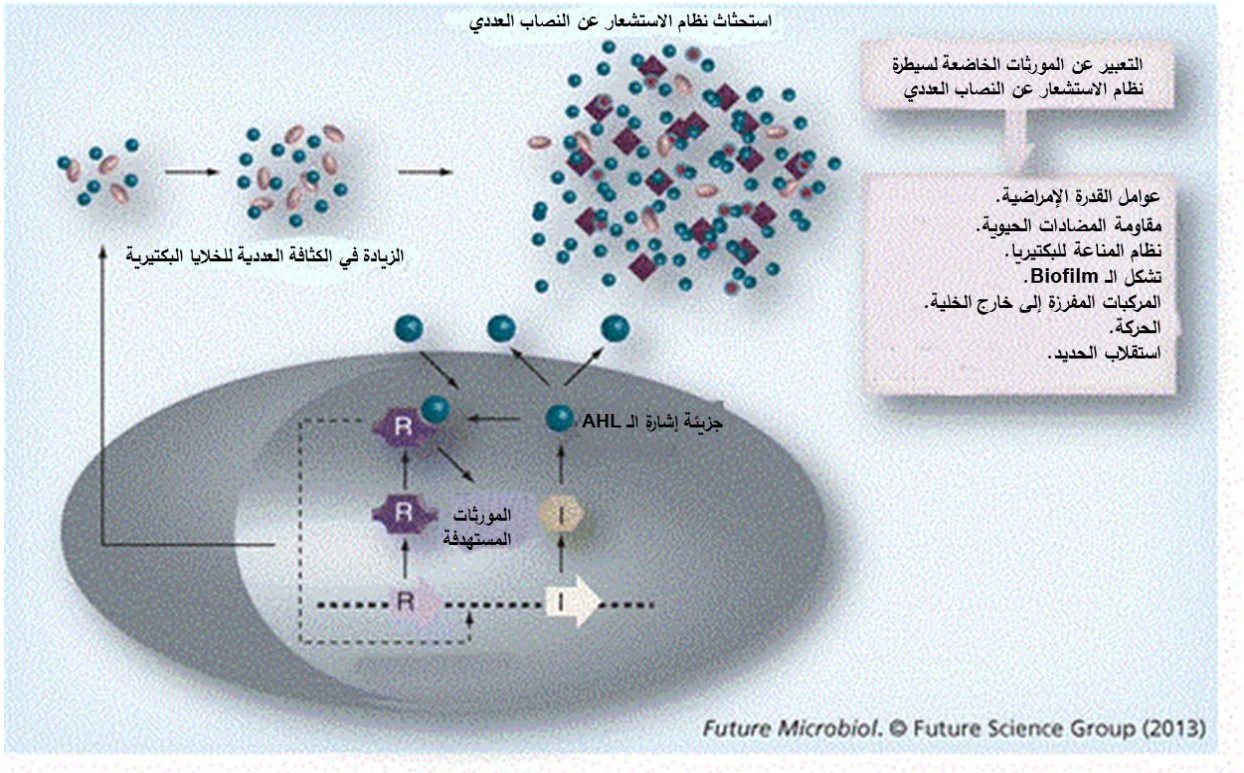
C- المحرضات الذاتية -2 (2-Autoinducer: فورانوسيل بورات ثنائي الإســـتر Furanosyl borate diester) هذه الجزيئات تنتج وتستخدم من قبل عدد من البكتيريا سالبة غرام وموجبة غرام وتشكل رابطاً تطورياً بين النوعين و تتوسط الـ QS بين الأنواع البكتيرية (Rezzonico وآخرون، 2012).

بينت الدراســـات الحديثة أن QS عند عدد من أنواع البكتيريا ســـالبة غرام بما فيها أنواع تابعة للجنس *Xanthomonas* يتوسطه جزيئات تنتمي إلى عائلتين جديدتين أطلق عليهما اسم عامل الإشـــــــــــــارة المنتشر Diffusible Signal Factor-family (DSF-family) وعائلة العامل المنتشـــر Diffusible Factor-family (DF-family) (Poplawsky وآخرون، 1998؛ He وآخرون، 2011). تتجلى أهمية المحرضـات الذاتية (الشـكل 5) إضـافة لما ذكر سابقا، بتحكمها بتعبير عدد كبير من المورثات كالقدرة على إنتاج الضوء كما في البكتريا *Vibrio fischeri* (Waters و Blasser، 2005)، وتنظيم تعبير المورثات المســـؤولة عن عوامل القدرة الإمراضـــية عند البكتيريا الممرضـة للنبات كالأنزيمات المحللة للجدر الخلوية كـــ Cellulase، Protease، Pectinase، وإنتاج لـ EPS وتشـــكل البيوفيلم Biofilm والحركة وإنتاج الســـموم ومقاومة الأكســـدة والمضـــادات الحيوية والإجهاد والتنفس الهوائي والتزاوج عند البكتيريا (Jayraman و Wood 2008)، والقدرة على تركيب المضـــادات الحيوية كما في *Erwinia amylovora*، والقدرة على التبوغ مثل *Bacillus sublitis*، والقدرة على التحكم في كفاءة الخلية البكتيرية في اســـتقبال DNA الغريب واستقبال الحديد (Siderophorse uptake) وغيرها من الوظائف (Papenfort و Bassler، 2016)، كما أنها توفر ميزة التنافس للخلايا البكتيرية في الأوساط الغذائية المختلفة عند بكتيريا الجنس *Xanthomonas* (Deng وآخرون، 2016).

الدراسة المرجعية



الشكل (4): أهم أنواع إشارات QS البكتيرية وتركيبها الكيميائي (Jayraman و Wood، 2008).

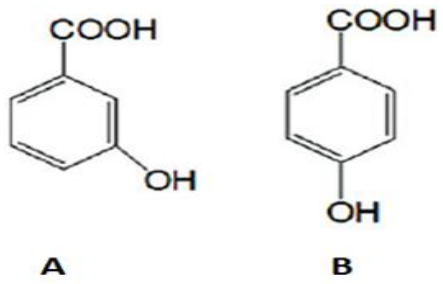


الشكل (5): الوظائف البيولوجية الخاضعة لـ QS (Jakobsen وآخرون، 2013).

الدراسة المرجعية

1-2-2-الاستشعار عن النصاب العددي عند أنواع الجنس *Xanthomonas*:

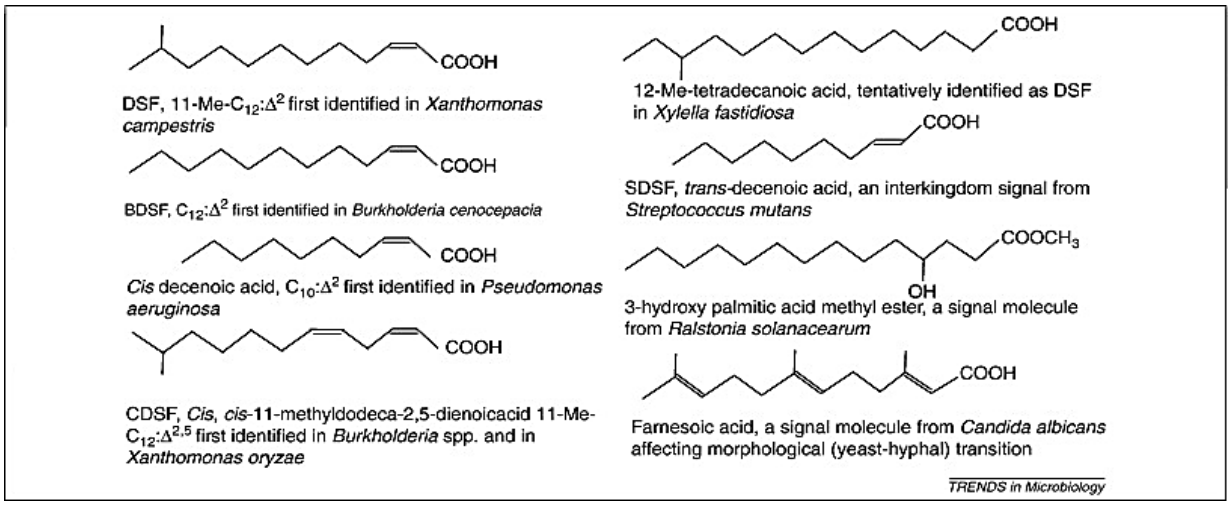
تتوسط الاتصالات البكتيرية-البكتيرية عند أنواع الجنس *Xanthomonas* عائلتان من الإشارات الجزيئية الكيميائية: العائلة الأولى **Diffusible Signal Factor-family (DSF-family)** والعائلة الثانية **Diffusible Factor-family (DF-family)**. وعُرف من عائلة DF إشارتان الأولى (3-HBA) 3-hydro xybenzoic acid (الشكل 6-A) التي تنظم تعبير مورثات *pig* المسؤولة عن إنتاج الـ Xanthomandin والثانية (4-HBA) 4-hydroxybenzoic acid (الشكل 6-B) التي تُستخدم كطليعة أنزيمية لاصطناع المركبات الضرورية للتنفس الهوائي عند البكتيريا اللفحة البكتيرية على الصليبيات Xcc واللفحة البكتيرية على الأرز Xoo وأنواع أخرى (Ryan وDow، 2008).



الشكل (6): الصيغة الكيمائية لجزيئتي عائلة DF: 3-hydroxybenzoic acid (A)، 4-hydroxybenzoic acid (B)

أما **عائلة DSF** فهي مشتقات حموض دهنية غير مشبعة Cis-2-unsaturated fatty acid (He وآخرون، 2011)، وتُصنّع من الكربوهيدرات والحموض الأمينية متفرعة السلسلة عبر دورة استطالة الحمض الدهني FAS (Zhou وآخرون، 2015). وُصف DSF لأول مرة بأنه cis-11-methyl-2-dodecenoic acid عند Xcc (Wang وآخرون، 2004)؛ وجد في السنوات القليلة الماضية الـ DSF عند البكتيريا Xoo (He وآخرون، 2010) ومرض التدهور السريع في العنب *Xylella fastidiosa* (Xf) (Chatterjee وآخرون، 2008)، كما اكتشف عدد من مشتقات جزيئة الإشارة DSF (الشكل 7) منها BDSF، CDSF، IDSF، 2-cis-hexadecenoic acid، 12-methyltetradecenoic acid، cis-2-tetradecenoic acid (He وآخرون، 2011؛ Zhou وآخرون، 2015؛ He وآخرون، 2015).

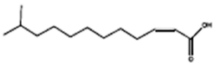
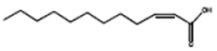
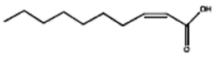
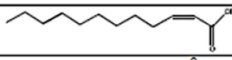
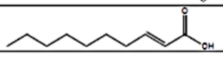
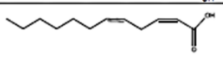
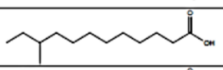
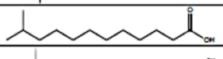
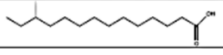
الدراسة المرجعية



الشكل (7): عامل الإشارة المنتشر الـ DSF ومشتقاته في الأنواع البكتيرية المختلفة (Ryan وDow، 2011).

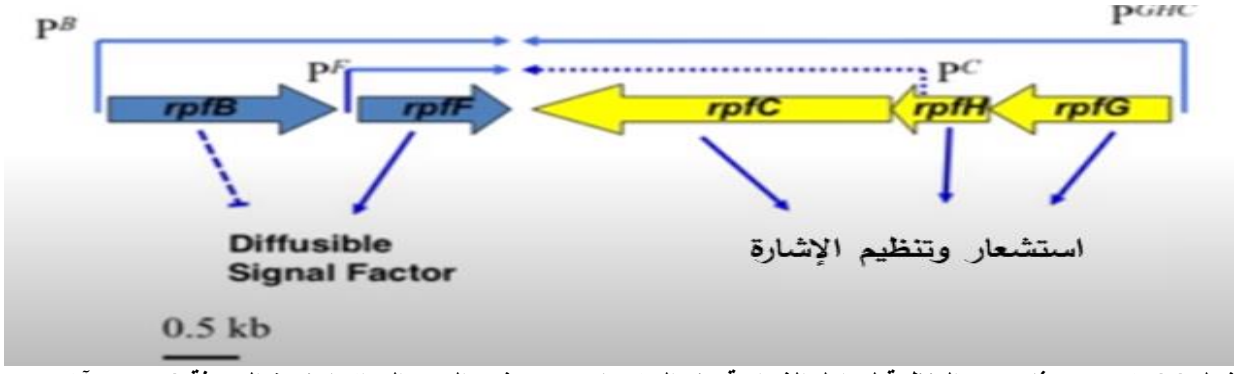
يتحكم الـ DSF ومشتقاته بعدد من الوظائف الحيوية عند البكتيريا المنتجة لها (الجدول 1) كاستعمار أنسجة العائل النباتي وقدرتها على النمو والتطور، وغيرها من عوامل الشراسة للبكتيريا المنتجة لها والضرورية لها في قدرتها الإمراضية على العائل النباتي.

جدول (1) أثر إشارات عائلة DSF على الوظائف الحيوية المختلفة عند البكتيريا المنتجة لها (Marques وآخرون، 2015)

اسم المركب الكيميائي	التسمية الجديدة	الصيغة الكيميائية	النوع البكتيري	الوظيفة البيولوجية
cis-11-Methyl-2-dodecenoic acid (DSF)	11-Me-C_{12}:Δ^2		*Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia multivorans*	عوامل القدرة الإمراضية، تشكل الـ Biofilm، تشكل المستعمرات، مقاومة المضادات الحيوية، الحركة، تثبيط نمو الهيفات الفطرية.
cis-2-Dodecenoic acid (BDSF)	C_{12}:Δ^2		*Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia lata* *Burkholderia stabilis* *Burkholderia vietnamiensis* *Burkholderia dolorosa* *Burkholderia ambifaria* *Burkholderia anthina* *Burkholderia pyrrocinia* *B. multivorans*, *X. oryzae*	عوامل القدرة الإمراضية، تثبيط نمو الهيفات الفطرية.
cis-2-Decenoic acid (*cis*-DA)	C_{10}:Δ^2		*Pseudomonas aeruginosa*	تشكل وتشتت الـ Biofilm، تشكل الخلايا البكتيرية، مقاومة المضادات الحيوية.
cis-2-Tetradecenoic acid	C_{14}:Δ^2		*Xylella fastidiosa*	عوامل القدرة الإمراضية.
trans-2-Decenoic acid (SDSF)	C_{10}:Δ^{2t}		*Streptococcus mutans*	تثبيط نمو الهيفات الفطرية.
cis-11-Methyldodeca-2,5-dienoic acid (CDSF)	11-Me-C_{12}:$\Delta^{2,5}$		*B. multivorans*, *B. stabilis* *B. anthina*, *B. pyrrocinia*, *X. oryzae*	تثبيط نمو الهيفات الفطرية.
10-Methyldodecanoic acid	10-Me-C_{12}		*S. maltophilia*	تحمل الإجهاد، مقاومة المضادات الحيوية.
11-Methyldodecanoic acid	11-Me-C_{12}		*S. maltophilia*	تحمل الإجهاد، مقاومة المضادات الحيوية.
12-Methyltetradecanoic acid	12-Me-C_{14}		*Xylella fastidiosa*	عوامل القدرة الإمراضية، تشكل الـ Biofilm، الحركة.

الدراسة المرجعية

ويتحكم بإنتاج عائلة الـ DSF قطعـة من الـ DNA وزنها الجزيئـــي (21.9 kb) وتســمى بـ ***R***egulation of ***P***athogenicity ***F***actors (*rpf*) (الشكل 8)، وتضم تسع مورثات *rpf* ABCDEFGHI (Barber وآخرين، 1997).



الشكل (8): توزع *مورثات rpf* المنظمة لعوامل الشراسة عند البكتيريا Xcc، ويشير السهم إلى اتجاه نسخ المورثة (Ryan وآخرون، 2015).

وحُددت وظائفها عند البكتيريا Xcc وXoo من خلال إجراء طفرات بـ Transposon mutagenesis، وكان عمل البروتينات الناتجة عن أهم المورثات المتحكمة في إنتاج وعمل إشارات عائلة الـ DSF عند البكتيريا:

المورثة F *Rpf*: ترمّز للبروتين RpfF وهو الأنزيم الرئيسي في إنتاج عائلة الإشارة DSF، وهو يملك وظيفتي Acyl-ACP-thioesterase و Dehydratase، الذي يرتبط مع عدة أنماط من Acyl-ACP كـ (11-methyl-3-hydroxydodecanoyl-ACP، 3-hydroxydodecanoyl –ACP، 10-methyl-3-hydroxydode canoyl-ACP) لتشكيل عائلة الإشارة DSF: DSF، BDSF، IDSF على التوالي (Ryan وآخرون، 2015)، عند حذف المورثة F *Rpf* أو إحداث طفرة فيها تفقد البكتيريا القدرة على إنتاج جزيئات عائلة DSF (He وآخرون، 2010).

المورثة B *Rpf*: ترمّز للأنزيم Fatty acyl-CoA-ligase الذي يفّعل تشكل الحموض الدهنية الحرة المشبعة المُشّكلة من قبل الفعالية الأنزيمية Thioesterase للـ RpfF، ما يسمح باستخدامها في تصنيع الفوسوليبيدات، وكذلك يعمل على تثبيط هذه الفعالية، كما يقوم هذا الأنزيم بهضم إشارات عائلة الـ DSF في الوسط في المراحل المتأخرة من النمو البكتيري بعد أن تكون البكتيريا عبرت عن عوامل الشراسة. عند حذف المورثة B *Rpf* أو إحداث طفرة

فيها يزداد مستوى الـDSF في معلق زرع البكتيريا Xcc، وتنخفض القدرة الإمراضية للبكتيريا (Zhou وآخرون، 2016؛ Ryan وآخرون، 2015).

المورثة C *Rpf* والمورثة **G *Rpf***: ترمزان للبروتينين RpfC وRpfG اللذين يعملان كنظام استقبال الإشارة من الوسط الخارجي ونقلها داخل الخلية لجعل البكتيريا تعبر عن عوامل الشراسة، يؤدي حذف المورثة C *Rpf* أو إحداث طفرة فيها إلى زيادة إنتاج عائلة DSF، وبالتالي تعد مُنظماً سلبياً لإنتاج الـ DSF، وكذلك تؤدي إلى انخفاض القدرة الإمراضية للبكتيريا وبالتالي تُعد منظم إيجابي للقدرة الإمراضية (Robert وMaxwell، 2011؛ Ryan وآخرون، 2015) .

تختلف عائلتا DSF وDF عن بعضهما بوضوح في المورثات المرمّزة والنشاط البيولوجي والخصائص الكيميائية. أشارت الدراسات الحديثة إلى أنّ إشارات عائلتي DSF وDF إما أن تعمل مستقلة عن بعضهما أو تعمل متآزرة معاً، حيث أشار He وآخرون (2011) إلى أنّ 3-HBA مسؤولة عن تنظيم تعبير المورثات *Pig* المرمزة لإنتاج الـ Xanthomonadin عند Xcc مستقلة عن عائلة DSF، فإن البكتيريا المعدلة وراثياً بحذف مورثتي F *Rpf* وC *Rpf* المسؤولتين عن إنتاج الـ DSF واستقباله لم يؤثر على قدرة البكتيريا Xcc على إنتاج الـ Xanthomonadin، في حين تتآزر إشارات عائلتي DSF وDF معاً في تحكمهما في تعبير المورثات المسؤولة عن إنتاج السكر المعقدة الخارجية ومقاومة بيروكسيد الهيدروجين وغيرها من الوظائف الأخرى (Chan وآخرون، 1998؛ He وآخرون، 2011). يهدف استخدام بكتيريا أنواع جنس *Xanthomonas* لإشارات عائلتي DSF وDF لتتوسط الـ QS عندها إلى تنظيم تعبير مورثات القدرة الإمراضية وجعها أكثر قدرة على التكيف مع الظروف البيئية المحيطة (He وآخرون، 2011؛ Darrasse وآخرون، 2014). فضلاً عن أثر DSF في تحريض المقاومة عند النبات تجاه الإصابة البكتيرية. هناك أيضاً آلية يمكن الاستفادة منها في الحد من تطور المرض تسمى خمد الاتصالات البكتيرية Quorum Quenching (QQ) التي تعمل على منع الاتصالات بين الخلايا البكتيرية، حيث أنَ النباتات لا تمتلك أنزيمات تساعد في تفكيك جزيئات المحرضات الذاتية التي تفرزها البكتيريا (Ryan وآخرون، 2011).

الدراسة المرجعية

1-3-خمد الاتصالات البكتيرية-البكتيرية Quorum Quenching:

تُعرّف الـ Quorum Quenching (QQ) بأنها استراتيجية واعدة للوقاية والسيطرة البيولوجية على أمراض النبات، فيعمل الـ QQ على تعطيل الهجوم البكتيري المعتمد على الكثافة العددية للبكتيريا، من خلال منع الخلايا البكتيرية من الاستشعار عن كثافتها العددية في الوسط الذي تعيش فيه، بتعطيل الإشارة التي تتوسط الـ QS، ويتحقق ذلك بأنزيمات مفككة للإشارة البكتيرية، أو استخدام جزيئات كيميائية مشابهة للإشارة تعمل على تثبيط عمل مستقبلات الإشارة، أو من خلال جعل الخلايا البكتيرية تحل إشاراتها بنفسها (Alagarasan وآخرون، 2017؛ Gan وآخرون، 2011، Dow وآخرون، 2016؛ Fan وآخرون، 2020). تعمل هذه الاستراتيجية الجديدة على إضعاف شراسة المسببات المرضية البكتيرية دون قتلها، وأمثلة على ذلك الأنزيم AiiA الذي تفرزه البكتيريا *Bacillus.* sp، والأنزيمين AttM وAiiB الذي تفرزهما البكتيريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens*، هذه الأنزيمات آنفة الذكر تتبع لعائلة Metallo-β-Lactonase التي تعمل على تحطيم حلقة اللاكتون في الإشارات التابعة لعائلة AHLs مؤدياً إلى فتحها. حيث أنَ النباتات المعدلة وراثياً والحاوية على المورثة *AiiA* لم تظهر عليها أعراض الإصابة المرضية النموذجية بالبكتيريا *Erwinia carotovora* على الرغم من وجود البكتيريا بتركيز عال داخل الأنسجة النباتية (Dong وZhang، 2005؛ Zhang وآخرون، 2002)، أما بالنسبة للإشارة DSF فقد أُشير إلى وجود عدد من البكتيريا القادرة على تفكيكها منها *Bacillus* sp. *sp. Paenibacillus*، *Microbacterium* sp.، *Staphylococcus* sp. و*Pesudomonas* sp. (Newman وآخرون، 2008)، تبّين في دراسة موسّعة على السلالة G من البكتيريا *Pseuodomonas* sp. أن الأوبيرون *CarAB* يرمّز للأنزيم كاربامويل فوسفات سينتاز (Carbamoyl-phosphate-synthase) الذّي يفكك الـ DSF (Newman وآخرون، 2008). كما أظهرت الدراسات الحديثة إلى فعالية الأنزيم FadT الذي تفرزه البكتيريا *Cupriavidus pinatubonensis* السلالة HN-2 في حل إشارة الـ DSF، فأُثبتت قدرتها على حل 2 mM من الإشارة DSF خلال 24 ساعة، فإن النباتات المعدلة وراثياً بمورثة *FadT* لم تبد أي أعراض مرضية عند إصابتها بالبكتيريا Xcc (Xu وآخرون، 2021).

الدراسة المرجعية

1-4-تشويش العامل الممرض Pathogen Confusion:

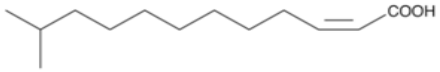
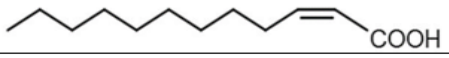
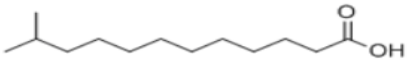
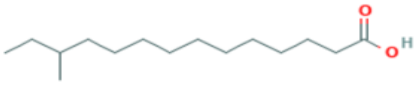
يُعرَف تشوش العامل الممرض بأنه تقنية جديدة في مكافحة أمرض النبات البكتيرية، تعتمد على التدخل في عمل إشارات التواصل الكيميائي التي تتوسط الـ QS من خلال رفع تركيزها في وسط نمو البكتيريا، مما يؤثر ذلك على توقيت حدوث الـ QS، مما تجعل البكتيريا تعبر عن عوامل قدرتها الإمراضية بشكل مسبق قبل الوصول إلى الكثافة العددية اللازمة لاستحثاث الـ QS، مما يساعد ذلك على تحفيز ردود الفعل الدفاعية في النبات ضد الأعداد القليلة من البكتيريا وعوامل القدرة الإمراضية (Caicedo، وآخرون، 2017)، استخدمت هذه التقنية لأول مرة في مكافحة مرض التدهور السريع على العنب أو الزيتون *Xylella fastidiosa* من خلال أصناف معدلة وراثياً بإضافة المورثة المسؤولة عن إنتاج إشارات عائلة الـ DSF، أو حقن جذع الأشجار بهذه الإشارات حيث أدت إلى تثبيط حركة البكتيريا في الأوعية الخشبية وإلى موتها (Lonescu وآخرون، 2016). كما أن التراكيز العالية من إشارات عائلة الـ DSF في وسط نمو البكتيريا Xcc وXoo أدت إلى تثبيط حركتها، وخفضت من إنتاج الأنزيمات المحللة للجدر الخلوية، وإنتاج السكريات المعقدة الخارجية، ومنعت تشكل الـ Biofilm مما أدى إلى انخفاض في نمو البكتيريا (Bi وآخرون، 2014؛ Rigano وآخرون، 2007؛ Vonjov وآخرون، 2007؛ Guo وآخرون، 2012، Tian وآخرون، 2022).

1-5-الاتصالات البكتيرية-البكتيرية عند البكتيريا Xcm:

بيّنت Naman وآخرون (2015) أن المورثة *Rpf* F المسؤولة عن إنتاج عائلة DSF عند الـ Xcm مختلفة عن مثيلاتها عند Xcc وXoo كما تبين ذلك من خلال التحليل المعلوماتي الحيوي، واستكمالاً للبحث السابق بيَن يونس وآخرون (2018) أنَ البكتيريا Xcm تفرز سبع مشتقات حمضية جزيئية تابعة لعائلة DSF وهي cis-2-hexadecenoic acid و cis-2-undecenoic acid و 11-methyldodecanoic acid و cis-11-methyl-2-dodecanoic acid (DSF) و cis-11-methyldodeca-2,5-dienoic acid (CDSF) و cis-2-dodecenoic acid (BDSF) و 12-methylte tradecanoic acid (الجدول 2). كما أشار يونس وآخرون (2018) أنَ كلاً من الإشارتين 2-cis-hexadecenoic acid و 11-methyldodecanoic-acid اكتشفتا لأول مرة عند أحد أنواع الجنس *Xanthomonas* sp.

الدراسة المرجعية

جدول (2) إشارات عائلة الـ DSF عند البكتيريا Xcm S101 (يونس وآخرون، 2018).

اسم جزيئة الإشارة	الصيغة الكيميائية
Cis-11-methyl-2-dodecenoic acid (DSF)	
Cis-2-dodecenoic acid (BDSF)	
Cis-11-methyldodeca-2,5-dienoic acid (CDSF)	
Cis-2-undecenoic acid	
11-methyldodecanoic acid	
12-methyltetradecanoic acid	
2-cis-hexadecenoic acid	

1-6-تحريض المقاومة عند النبات:

تهاجم الفطريات والبكتيريا والفيروسات وغيرها من الآفات الضـــارة النباتات في محاولة للحصول على الغذاء منها. خلال حقبة التطور، طورّت النباتات والمســببات المرضــية ميزات لمواجهة بعضــهم البعض، فجُهّزت النباتات بأليات دفاعية سريعة ومتطورة، في حين طوّرت المسببات المرضية استراتيجيات خاصة للتغلّب على هذه الدفاعات، وصــف التفاعل بين أنظمة الدفاع النباتية وآليات قمعها بواســطة المســببات المرضــية بأنه نموذج متعرّج " Zigzag model" (Dalio وآخرون، 2017). إن توقيت الاســتجابة الدفاعية أمر حاســم ينعكس على الفرق بين المواجهة والخضــوع لهذا التحدي الأحيائي المتمثل في مسـببات الأمراض / الطفيليات الإجبارية، إذا جرى تشـغيل آليات الدفاع بواسـطة حافز قبل الإصـابة بمسـببات الأمراض النباتية يمكن تقليل المرض (Choudhary وآخرون، 2007). كان من المعروف جيداً لأكثر من 100 سنة أنّ النباتات يمكن أن تملك مقاومة مسبقة ضد طيف من المسببات المرضية وســميت هذه الظاهرة بالمقاومة الفطرية المكتســبة (Chester، 1933) وتشــمل المقاومة على ســبيل المثال جدار الخلية، والكيوتيكل التي تعمل حواجز فيزيولوجية أمام بعض المسببات المرضية. وتتكون الأنظمة الدفاعية في النباتات من أنظمة مراقبة تدرك العديد من محفزات الكائنات الدقيقة، والتي تســمح للنباتات بالانتقال من وضــع النمو والتطور

إلى الوضع الدفاعي ضد معظم الكائنات الدقيقة الضارة (Schikora وآخرون، 2016). ظهر مصطلح المقاومة الجهازية المكتسبة عندما اكتشفها (Ross، 1961) في أوراق التبغ المصابة بـ TMV (Tobacco Mosaic Virus)، ومنذ ذلك الحين أجريت عدة أبحاث لفهم الآليات المختلفة للمقاومة المستحثة، وأثرها الفعّال ضد المسببات المرضية كالبكتيريا والفيروسات والفطريات وكذلك الحشرات الضارة.

1-6-1-المقاومة الجهازية المكتسبة Systemic Acquired Resistance:

هي شكل من أشكال المقاومة التي تُنشط في جميع أنحاء النبات بعد تعرضه لمحفزات من مسببات مرضية شرسة (محدثة للمرض) أو غير شرسة (غير محدثة للمرض) أو محفزات كيميائية مصنّعة مثل Chitosan أو حمض الصفصاف Salicylic acid (SA)، ويتميز تحريض المقاومة الجهازية المكتسبة SAR بتراكم SA الذي يحفّز أليات الدفاعية عند النبات، وهي ناتجة في كثير من الأحيان عن فرط حساسية محلية، إن حمض الصفصاف ليس عامل إشارة متنقلاً، ولكن يُقترح أنه أول مادة كيميائية تعمل على تحريض تعبير المورثات المرمّزة للبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض وخاصة PR-1، إنّ مورثات البروتينات المرتبطة بالعامل الممرض ترمّز إلى البروتينات مثل Chitinase وβ-1-3-glucanase وغيرها التي تؤثر في منع استعمار المسببات المرضية لأنسجة المضيف أو إبطائه (Hartman وآخرون، 2016).

1-6-2-المقاومة الجهازية المستحثة Induced Systemic Resistance:

تُنشط المقاومة الجهازية المستحثة ISR على نحو مماثل لـ SAR من قبل محفزات كيميائية، ولكن هذا التحفيز مرتبط ببكتيريا الجذور PGPR، والفطريات المفيدة، كما يختلف ISR عن SAR أيضاً بأنه مستقل عن مسار SA ولا يقوم بتحريض تعبير مورثات المرمّزة للبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض أو فرط الحساسية، ولكن في بعض الحالات يمكن أن يحفّز إنتاج Siderphores أو SA على غرار SAR، وإنّ كلاً من الهرمونات النباتية حمض الياسمين، والإيثيلين ضرورية لتفعيل ISR (Hartman وآخرون، 2016)، يشار إلى هذه الظاهرة باسم المقاومة الأولية (Priming) وهي قدرة النباتات على تحفيز الدفاعات الأولية وبالتالي تفعيل مسارات ISR لتكون أكثر فعالية ضد المسببات المرضية (Hartman وآخرون، 2016).

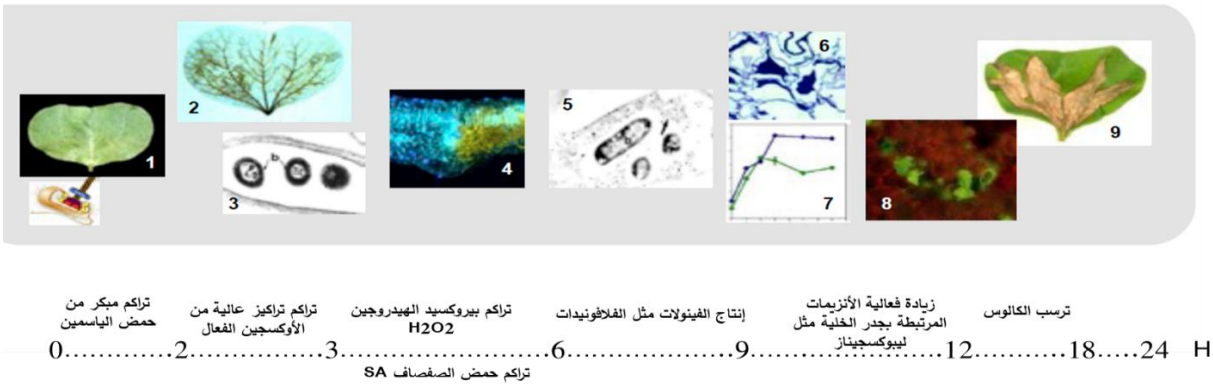
1-7-المقاومة في نبات القطن:

تعتمد المقاومة في نبات القطن ضد البكتيريا Xcm على التفاعلات المتوافقة وغير المتوافقة بينهما.

A- **التفاعلات المتبادلة التوافقية:** يحدث التفاعل التوافقي بين نبات القطن غير المقاوم والبكتيريا Xcm التي تمتلك مورثات شراسة، وبالتالي يكون نبات القطن عرضة للإصابة بـــ Xcm، في هذا التفاعل لا يحدث أي شكل من أشكال ردود الفعل الدفاعية كتراكم حمض Salycilic acid (SA) والضغط التأكسدي (Jalloul وآخرون، 2015).

B- **التفاعلات المتبادلة غير التوافقية:** تحدث التفاعلات المتبادلة غير التوافقية بين مورثات المقاومة في نبات القطن ومورثات عدم الشراسة للبكتيريا Xcm، يؤدي تعرف أنسجة الأصناف المقاومة بشكل مبكر على البكتيريا Xcm إلى حدوث فرط الحساسية Hypersensitive response مبدياً أعراض تماوت موضعي في مكان حدوث العدوى لحصر الممرض في مكان دخوله (Delannoy وآخرون، 2005).

ويترافق فرط الحساسية التي تحدث في نبات القطن مجموعة من الأحداث الفيزيولوجية والجزيئية (الشكل 9):



الشكل (9) الأحداث المرافقة لفرط الحساسية عند نبات القطن ضد البكتيريا Xcm (Jalloul وآخرون، 2015).

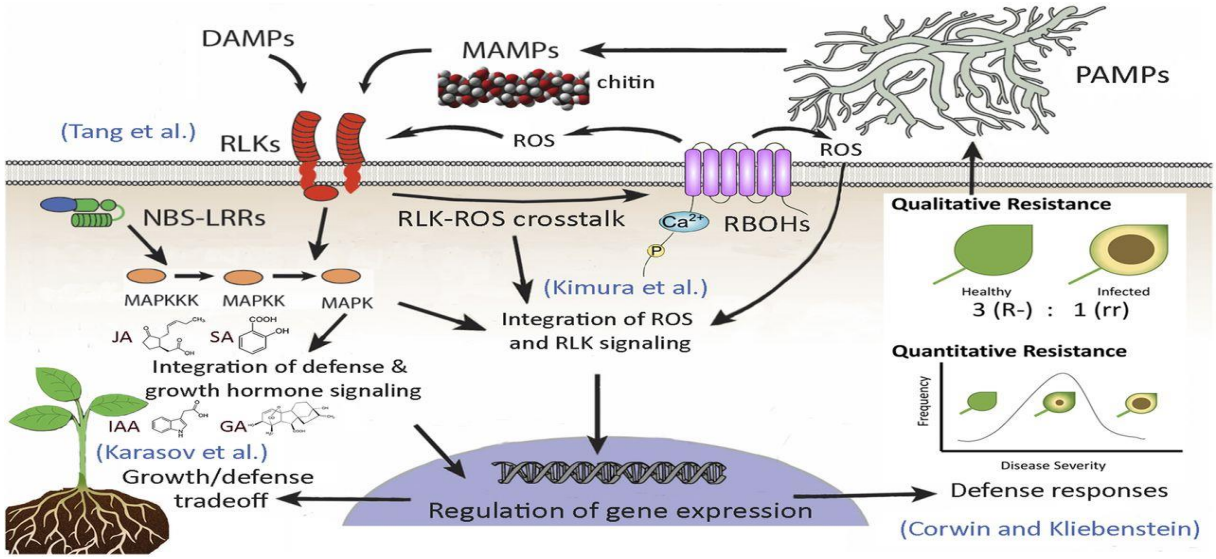
وقد جرت الاستفادة من فهم الآليات الجزيئية والفيزيولوجية المرافقة لفرط الحساسية في تحريض المقاومة عند النباتات والتي تُعد من طرائق المكافحة الناجحة في الحد من نسبة الضرر الاقتصادي الذي تحدثه Xcm، فقد أدت معاملة النباتات قبل حدوث الإصابة بأحد المركبات (حمض الصفصاف، فوسفات البوتاسيوم القلوي، فوسفات البوتاسيوم الحمضي، حمض الستريك، حمض البنزويك) إلى تحفيز الدفاعات النباتية وخفض نسبة الضرر الاقتصادي (Atiq وآخرون، 2017).

الدراسة المرجعية

1-8- دور المركبات الكيمائية في ردود الفعل الدفاعية في النبات:

كان حمض الصـــفصـــاف SA أول مادة كيمائية أظهر قدرته على تحفيز ردود الفعل الدفاعية عند النبات وذلك عندما تم معاملة نبات التبغ خارجياً بـــ SA المصـنّع كيمائياً لزيادة مقاومته ضـد TMV (White وآخرون، 1979)، أظهرت دراســات عديدة فعالية نظائر SA مثل Acibenzolar-S-methyl (ASM) بتحفيز الآليات الدفاعية عند النبات، حيث أدى إلى تحفيز تراكم Mitogen-activated protein Kinase-3 (MAPK-3) والحمض النووي الريبي الخاص بالبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض من النمط PR-1 (RNAm-PR-1) والذي حفّز المسارات الدفاعية عند النبات كحمض الياسمين والإيثيلن (Hartman وآخرون، 2016). ومن محفزات المقاومة أيضــاً Chitin ومشــتقاته Chitosan (Hartman وآخرون، 2016). تمتلك الخلايا النباتية عدداً كبيراً من المستقبلات الأساسية على سطحها، التي تعد أساسيةً وحاسمةً للاستشعار عن الإشارات خارج الخلية ولأجل التواصل بين الخلايا (Dalio وآخرون، 2017)، إن مســتقبلات التعرّف على الأنماط الجزيئية Pattern Recognition Receptors (PRRs) تعمل " كهوائي" خلوي تسمح للنباتات بالكشف عن مجموعة واسعة من المحفزات غير الذاتية (PAMPs، MAMPs، HAMPs، VAMPs؛ الأنماط الجزيئية المرتبطة بالممرض، الميكروبات، آكلة الأعشــاب، الفيروســات على التوالي) أو المحفزات المشــتقة ذاتياً (DAMPS؛ الأنماط الجزيئية المرتبطة بالضــرر) التي تتحرّر عندما تتعرض النباتات لهجوم آكلات الأعشاب أو إصابتها بالمسببات المرضية (الشكل 10). يمثل وجود PRRs خطوة حاسمة لإدراك المضيف النباتي والدفاع عن نفسه ضد الآفات المختلفة من خلال إثارة المناعة الطبيعية في النبات (Dalio وآخرون، 2017). وتضم PRRs مستقبلات مشابهة للكيناز متموضعة في الغشاء السيتوبلاسمي RLKs ومســتقبلات مشــابهة للبروتين RLPs (Dalio وآخرون، 2017). تعد MAMPs تركيبات أســاســية للميكروبات، ولهذا السبب حفظت في الكائنات الممرضة وغير الممرضة، تتعرف المستقبلات الموجودة على سطح الخلية النباتية PRRs على جزيئات MAMPs (الجدول 3) وتعد هذه المرحلة هي الأولى في حث الدفاعات النباتية وتسمى المقاومة المرتبطة بـ MAMPs ومن جزيئات MAMPs عديدات السكر الليبيدية Lipidopolysaccarides (LPS)، وعامل الاستطالة TU، وبعض الحموض الدهنية (Newman وآخرون، 2002؛ Silipo وآخرون، 2005).

وينتج عن ردود الفعل الدفاعية الناتجة عن MAMPs إنتاج أنواع من الأوكسجين الفعّال (ROS، الضغط التأكسدي)، وإنتاج أنواع من النيتروجين الفعال مثل أوكسيد النتريك (NO) التي تعمل كإشارات ولها تأثير مضاد بكتيري مباشر، وتغيرات في تركيبة جدار الخلية النباتية، وتحفيز إنتاج المركبات المضادة للميكروبات والبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض (Dalio وآخرون، 2017). أما بالنسبة لجزيئات DAMPs (الجدول 3) فهي جزيئات مشتقة من النبات تؤثر في تحفيز ردود الفعل الدفاعية فيها وعلى سبيل المثال نظام الببتيد 18 aa في البندورة هو محفّز داخلي لردود الفعل الدفاعية في النبات، والبروتين Systemin المُحرّر عند تلف الخلايا النباتية يعمل محفّزاً وأيضا Oligogalacturonides وغيرها ...إلخ (Dalio وآخرون، 2017). ومن ناحية أخرى تشير بعض الأبحاث الحديثة إلى أثر الحموض الدهنية في النبات في تحفيز ردود الفعل الدفاعية للنبات تجاه المسببات المرضية، فإنَ الحموض الدهنية هي جزيئات ضخمة تؤثر تأثيراً أساسياً في التركيبات الهيكلية ووظيفة إشارة، وتحدد وظائف الإشارة للحموض الدهنية في النبات من خلال طول سلسلة الأسيل ومستويات عدم التشبّع، وإنّ الإجهادات المرتبطة بالاستجابة تؤدي إلى إطلاق الحموض الدهنية الناتجة من التمثيل الغذائي من الأغشية الخلوية، ويتم تحويل الحموض الدهنية في النبات إلى مركبات وسيطيه نشطة بيولوجياً عبر العمليات الأنزيمية وغير الأنزيمية، حيث تعمل الحموض الدهنية على تعديل مسارات نقل الإشارة من خلال التفاعل مع عوامل النسخ (Walley وآخرون، 2013).



الشكل (10) ألية عمل جزيئات PAMPs، DAMPs، MAMPs (Eckardt، 2017).

الدراسة المرجعية

وأظهرت الدراســـات أن بعض النباتات عملت على زيادة تركيز بعض الحموض الدهنية لمقاومة المســـببات المرضـــية، على ســـبيل المثال نبات الباذنجان الذي اعتمد نهج زيادة مســـتوى حمض C:16 (Palmitoleic acid) لمقاومة الفطر *Verticillium dahlia* (Xing و Chin، 2000)، تقوم الخلايا النباتية بتحرير الحموض الدهنية غير المشبعة والتي تعد من المكونات الأساسية للغشاء اللبيدي بواسطة أنزيم Lipase رداً على الهجمات من قبل المسببات المرضـــية، كما تؤثر تأثيراً محورياً في تفاعلات النبات – الميكروب، إما مباشـــرة كحموض حرة أو من خلال وظائف Oxylipins، وأشـــارت بعض الدراســـات إلى أن زيادة مســـتوى الحمض الدهني C18:2 والعائد لعائلة المشـــتقات المؤكسدة في النبات تعمل على زيادة مقاومته ضد الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* (Calvo وآخرون، 1999). وأشارت بعض الدراسات الحديثة إلى أنّ إشارات التواصل البكتيري يمكن أن تعمل كجزيئات PAMPs التي تحفز ردود الفعل الدفاعية (Schikora وآخرون، 2016).

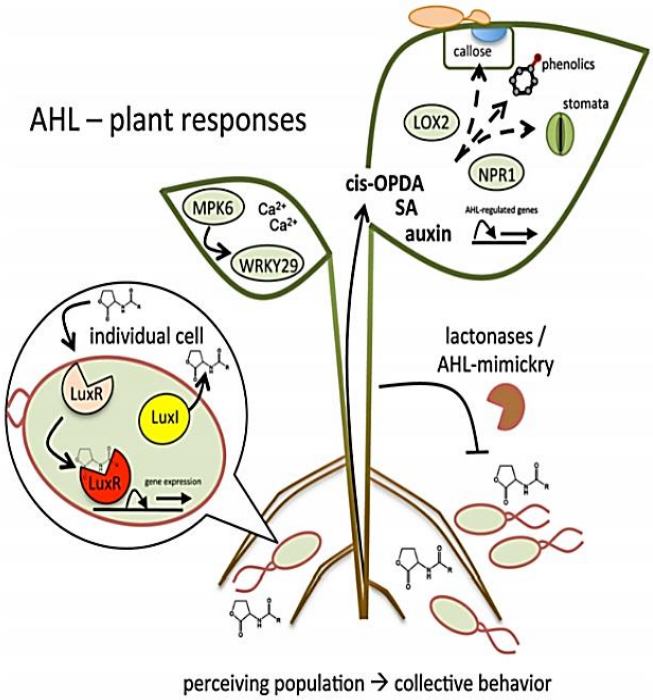
الجدول (3) الأنماط الجزيئية المختلفة لـ MAMPs، DAMPs (Hartman، 2016):

اسم الجزيئة	المستقبل على سطح النبات	المراجع
MAMPs		
Flagellin (Flg; flg22)	FLS2 (*Arabidopsis*)	Felix et al., 1999; Gómez-Gómez et al., 2001
Elongation factor TU (EF-Tu; elf18/26)	EFR (*Arabidopsis*; Brassicaceae)	Kunze et al., 2004
Peptidoglycan (PGN)	Lym1 and Lym3 (*Arabidopsis*)	Gust et al., 2007; Erbs et al., 2008a; Willmann et al., 2011
Lipopolysaccharide (LPS)	Not identified	Newman et al., 1995
Bacterial cold shock proteins (RNP1 motif)	Not identified	Felix and Boller, 2003b
Bacterial superoxide dismutase (Sod)	Not identified	Watt et al., 2006
Activator of XA21 (Ax21)	XA21 and XA21D (rice)	Song et al., 1995; Wang et al., 1998; Lee et al., 2009
Beta-Glycan (GE)	GEBP (putative receptor soyabean)	Darvill and Albersheim, 1984; Umemoto et al., 1997
Chitin	CeBip and CERK1 (rice); AtCERK1 (*Arabidopsis*)	Felix et al., 1993; Kaku et al., 2006; Miya et al., 2007; Shimizu et al., 2010
Avirulence on Ve1 tomato (Ave1)	Ve1 (putative tomato receptor)	Kawchuk et al., 2001; Thomma et al., 2011; de Jonge et al., 2012
Xylanase (EIX)	EIX (tomato)	Bailey et al., 1990; Ron and Avni, 2004
Pep-13 (An oligopeptide of 13 amino acids from *P. mega-sperma*)	Not identified	Nürnberger et al., 1994
Cellulose-binding elicitor lectin (CBEL) from *Phytophthora*	Not identified	Mateos et al., 1997; Séjalon-Delmas et al., 1997 Gaulin et al., 2006
DAMPs		
Systemin	Not identified	Narváez-Vásquez and Ryan, 2004
Pep1 (23 aa part of a cytosolic protein from *Arabidopsis*)	PEPR1 (*Arabidopsis*)	Huffaker et al., 2006; Yamaguchi et al., 2006
Oligogalacturonides (OGs)	WAK1 (*Arabidopsis*)	Nothnagel et al., 1983; Brutus et al., 2010
Cutin	Not identified	Schweizer et al., 1996; Kauss et al., 1999

1-9- دور إشارات الـ QS في ردود الفعل الدفاعية في النبات:

1-9-1-إشارات Acyl Homoserine Lactones:

أشـارت الدراسـات الحديثة أنّ التفاعلات المتبادلة بين النبات والبكتيريا يمكن أن تنظّمها الإشـارات البكتيرية، هذه الدراسـات أثارت اهتمام العلماء في العصـر الحديث بسـبب الآثار الإيجابية لمختلف إشـارات التواصـل البكتيري على النبات، بدءاً من تعزيز قدرة النباتات على النمو إلى تحفيز ردود الفعل الدفاعية عندها ضـد المسـببات المرضـية المختلفة، في الآونة الأخيرة بدأ العلماء فهم الأليات الجزيئية التي تقوم عليها اسـتجابة النباتات لإشـارات التواصـل البكتيري (Schikora وآخرون، 2016). إنّ الدراسـة الأولى التي أشـارت إلى تأثير إشـارات التواصـل البكتيري من عائلة AHLs على فيزيولوجية النبات نشـرت في عام 2003 من قبل العالم Mathesius وآخرون، وأكدوا أنّ البروتينات المرتبطة بالدفاع والإجهاد، والبروتينات المرتبطة باسـتقلاب الفلافونيدات، والهرمونات، وعدد من البروتينات المنظّمة قد تراكمت تفاضلياً كما تبيّن من خلال تحليل البروتينات في النباتات المعاملة بـ AHLs (الشكل 11). يعتمد تأثير إشـارات AHLs على النباتات على إشـارات Cyclic-GMP وإنتاج بيروكسـيد الهيدروجين وأكسـيد النيتروجين (von Rod، 2008).



الشكل (11) ألية تأثير إشارات AHLs على مقاومة النبات (Schicora وآخرون،2016).

الدراسة المرجعية

وجدت الدراسات السابقة أنّ لإشارات عائلة AHLs وظيفتين، فإنَ الإشارات ذات سلسلة كربونية قصيرة كـ (C4، C6) تعمل على تحسين الصفات الشكلية والإنتاجية والنمو عند النباتات المعاملة بها من خلال زيادة مستوى الأوكسينات والسيتوكينات التي تؤدي إلى زيادة معدل نمو جذور النباتات، وتحسن فتح المسامات التنفسية وبالتالي تعزيز تدفق المياه والمعادن ضمن النباتات (Hartman وآخرون، 2016)، ومثال على ذلك أشار Moshynets وآخرون (2019) أن معاملة بذور القمح الشتوي (*Triticum aestivum*) بالإشارة البكتيرية C6–HSL قد حسنت من إنبات البذور وزاد من سرعة نمو النبات ومن الإنتاجية الكلية لنبات القمح، كما أنه زاد من نمور الجذور وحسّن مقاومة النبات ضد الآفات، بينما الإشارات ذات السلسلة الكربونية الطويلة (C12، C14، C8) قد حفزّت ردود الفعل الدفاعية في النباتات المعاملة بها في ظاهرة تسمى تحفيز المناعة الأولية AHL–priming ضد طيف واسع من المسببات المرضية (von Rod، 2008، Schikora وآخرون، 2016)، وأشار Liu وآخرون (2020) أن نبات البندورة المعامل مسبقاً بالإشارة C8–HSL أدى إلى تحفيز المقاومة فيها ضد بكتيريا التبقع البكتيري على البندورة *Pesudomonas syringae* pv. *tomato*. إنّ المقاومة النباتية المُحدثة من قبل إشارات AHLs هي مقاومة أولية Priming، لوحظت عند معاملة أنواع مختلفة من النباتات بإشارات AHLs. تعتمد هذه المقاومة على الإدراك غير المفهوم لجزيئات AHLs من خلال المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا النباتية، مما يؤدي إلى إطلاق سلسلة إشارات تعتمد على أنزيماتMAP Kinase، والتعبير الزائد لعوامل النسخ من النمط WRKY–Tube، وتقوم الأنظمة الجهازية في النباتات التي حدثت فيها مقاومة أولية من النمط AHL–priming بتراكم كميات كبيرة من Oxylipins وSA التي تتحكم بردود الفعل الدفاعية اللاحقة في النبات مثل ترسب الكالوس، وتراكم المركبات الفينولية، وإغلاق المسارات، وتشكل اللجنين في جدران الخلايا (Schikora وآخرون، 2016). أشارت الدراسات الحديثة أنّ معاملة نبات البازلاء *Pisum* sativum والفصة البرميلية *Medicago truncatula* بالإشارة 3–oxo–C14–HLS المفرزة من قبل البكتيريا *Sinorhizobium meliloti* قد عزّز من تشكل العقد الجذرية للنباتات السابقة (Vallejos وآخرون، 2014). بينما معاملة نبات البندورة بالإشارة Oxo–C14–HLS قد حفّز لديها ردود فعل دفاعية وأصبحت مقاومة ضد فطر اللفحة المتأخرة (Hernandez وآخرون، 2014) بينما عند معاملة نبات

الدراسة المرجعية

.*Arabidopsis* sp والشعير بها حفّزت المقاومة لديها ضد المسببات المرضية المختلفة. كما أنّ معاملة نبات الخيار بإشارات AHLs المفرزة من قبل البكتيريا *Serratia plymuthica* HRO-C48 حفّز ردود الفعل الدفاعية فيه ضد الفطريات المسببة لسقوط البادرات كـــ *Pythium aphanidermatum* (Hernandez وآخرون، 2014)، وغيرها من الأمثلة الأخرى (الجدول 4).

جدول (4) أهم التأثيرات التي تحدثها إشارات AHLs على أنواع نباتية مختلفة (Schictoria وآخرون،2016).

AHL	التأثير	النبات	المراجع
C4-HSL	ارتفاع الكالسيوم داخل الخلايا	*Arabidopsis*	Song et al. (2011)
C4-HSL, C6-HSL, C8-HSL	نمو الجذر الرئيسي	*Arabidopsis*	Liu et al. (2012), von Rad et al. (2008)
Serratia liquefaciens (C4-HSL, C6-HSL)	مقاومة أمراض التنكرز، ارتفاع مستوى SA، تنظيم تعبير مورثات المقاومة	Tomato	Schuhegger et al. (2006)
Serratia phymuthica (AHL+)	مقاومة أمراض التنكرز	Tomato, Beans, Cucumber	Pang et al. (2009)
C6-HSL	تغيير في الأوكسينات، السيتوكينات	*Arabidopsis*	von Rad et al. (2008)
Oxo-C6-HSL	مقاومة أمراض التنكرز	*Arabidopsis*	Zhao et al. (2015)
C6-HSL	نمو الجذر الرئيسي.	*N. attenuata*	Heidel et al. (2010)
C6-HSL, C8-HSL	التحسس لآكلة الأعشاب	*Arabidopsis*	Schenk et al. (2012)
Oxo-C8-HSL	نمو الجذر الرئيسي.	Arabidopsis	Miao et al. (2012)
Oxo-C8-HSL	تغيير في البروتينات المرتبطة	*Arabidopsis*	Palmer et al. (2014)
C6-HSL, oxo-C10-HSL, Oxo-C14-HSL	التحكم بنمو الجذر الرئيسي، مستوى الإيثلين مستقبلات محددة لأنواع إشارات الـ AHL	*Arabidopsis*	Schenk et al. (2014)

1-9-2-إشارات عائلة Diffusible Signal Factor:

تشـــير مجموعة متزايدة من الأبحاث إلى أنَ الحموض الدهنية الخارجية غير المشـبعة (التي لا تنتجها النباتات) تؤثر تأثيراً مهماً في تحفيز الردود الدفاعية عند النبات، ويمكن أن تؤثـر على التفاعـلات بين النبات والكائنات الدقيقة (Upchurch وآخرون، 2008؛ Kachroo وآخرون، 2001، 2003؛ Savchenko وآخرون، 2010)، تعمـــل الحمـوض الدهنية الخارجية غير الشـائعة في النباتات والتي توجد عند فطور البيضية Oomycetes مثل Eicosapentaenoic acid و Arachidonic acid و Eicosaployenoic acid كمحفزّات PAMPs قوية للاستجابة الدفاعية في نباتات الفصيلة الباذنجية (Knight وآخرون، 2001)، وتحفز المقاومة عند النبات من خلال تحريضها لسلسة من الردود الفعل الدفاعية مثل الضغط التأكسدي، وتنشيط المورثات الضرورية لاصطناع Phytoalexin و Lignin، والموت الخلوي المبرمج، وغيرها من الردود المرتبطة بفرط الحساسية، أو التأثير على مسـار

Jasmonic acid (JA) ومسار Allene Oxide (AOS) (Savchenko وآخرون، 2010؛ Bostock وآخرون، 2005)، وأشـــارت الدراسـات السابقة إلى أنّ حالـــة عدم التشـــبع Cis–unsaturtion هي خاصية أساسية ومهمة للحموض الدهنية آنفة الذكر لكي تعمل كمحفزات لردود الفعل الدفاعية في النبات (Bostock وآخرون، 2005)، حيث تتأكسد بطريقتين الأولى بواسطة الأوكسجين الفعال Reactive oxygen species (ROS) والثانية بواسطة أنزيم Lipoxigenase وتكون نواتج الأكسدة هي هيدروكسي بيروكسيداز والتي تخضع لمسارات استقلاب مختلفة منها مسار Oxylipin والذي ينتج منه حمض الياسمين JA الذي يؤدي تأثيراً مهماً في الاستجابات الدفاعية عند النبات من خلال نقل الإشارات الخلوية التي تلعب دوراً في تحريض ردود فعل دفاعية في النبات (Vicente وآخرون، 2012)، وبما أنّ إشارات عائلة الـ DSF من مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة الحاوية على رابطة مزدوجة عند الموضع 2، وقد ثُبت أنها ميزة هيكلية رئيسية كجزيئة إشارة تتوسط الـ QS (Bostock وآخرون، 2005)، فيتم التعّرف عليها من قبل النباتات بمسارات مشابهة لمسارات التعّرف على الحموض الدهنية غير المشبعة، حيث سببت إشارة الـ DSF المُرتشحه إلى داخل أنسجة النبات مثل أوراق نباتات التبغ *Nicotiana bethamiana* والرز *Oryzae* ونبات .*Arabidopsis* sp رد فعل مشابه لفرط الحساسية، وأدى إلى تراكم المركبات الوميضية، وإنتاج بيروكسيد الهيدروجين، وترسب الكالوس، والتعبير عن المورثات المرمّزة لبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض، ومقاومة النبات للعدوى اللاحقة (Kakkar وآخرون، 2015)، وأشار Alavi وآخرون (2013) إلى أن معاملة بذور نبات اللفت الزيتي *Rapseed* بإشارة DSF بتراكيز معينة قد حسَن من معدل نموه وصحته وزاد معدل إنبات بذوره، وبالتالي فإنَ فهم آليات التحفيز في النباتات من جهة، وإدراكها لجزيئات إشارات QS البكتيرية من جهة أخرى يعزِّز القدرة على معرفة التفاعلات بين النبات والبكتيريا، وبالتالي اقتراح استراتيجيات لاستخدام إشارات التواصل البكتيري في مجال وقاية النباتات.

الدراسة المرجعية

الفصل الثاني

مواد وطرائق العمل Materials and Methods

2-1-العزلة البكتيرية وأوساط النمو ومكان تنفيذ العمل:

أُستخدمت العزلة البكتيرية المحلية Xcm S101 المعزولة من بذور القطن صنف حلب 33 من مخبر ممرضات النبات البكتيرية في كلية الزراعة –جامعة دمشق. **واستخدمت الأوساط الغذائية: الآغار المغذي Nutrient Agar (NA)**: بيبتون 0.5%، خلاصة اللحم 0.3%، سكروز 1%، خلاصة الخميرة 0.1 %، آغار 1.5%، pH=7. **المرق المغذي Nutrient Broth (NB)**: بيبتون 0.5%، خلاصة اللحم 0.3%، سكروز 1%، خلاصة الخميرة 0.1%، pH=7، **بهدف تنمية البكتيريا ولاستخلاص إشارات عائلة الـ DSF**. ونفذت التجارب في مخبر ممرضات النبات البكتيرية–كلية الزراعة–جامعة دمشق.

2-2-العدوى الاصطناعية على نبات القطن:

أُختبرت القدرة الإمراضية للعزلة Xcm S101 على الأوراق الفلقية لنبات القطن من خلال زراعة بذور قطن صنف حلب 33 في أصص بسعة 1 كغ حاوية على تورب معقم ضمن البيت الزجاجي (8/16 ساعة ضوء/ ظلام، 28°C وبرطوبة 80% نسبياً)، وحُضنت حتى بلوغ الأوراق الفلقية بعمر 10 أيام، حيث أجريت عدوى اصطناعية بطريقة الحقن بمعلق بكتيري بعمر 24 ساعة وبكثافة ضوئية OD_{600} =0.1 (~2*10^8 CFU\mL) من العزلة البكتيرية Xcm S101 باستخدام سرنغ دون إبرة (Margaret وآخرون، 1992) للتأكد من قدرتها الإمراضية.

2-3-استخلاص جزيئات عائلة الـ DSF من وسط زرع البكتيريا Xcm S101:

أُستخلصت جزيئات عائلة الـ DSF من وسط زرع البكتيريا Xcm S101، وأُتبعت طريقة Zhou وآخرون (2017) مع بعض التعديلات التي أجراها يونس وآخرون (2018)، فنميت العزلة البكتيرية Xcm S101 على وسط الزرع NA وحُضّنت عند درجة حرارة 28ºC لمدة 48 ساعة، ثم أُخذت مستعمرة بكتيرية واحدة بعمر 24 ساعة لتلقيح 40 mL من الوسط NB ضمن دورق مخروطي بسعة 200 mL، وحُضّنت مع الرّج ضمن الحاضنة الرجاجة على سرعة 200 دورة/ دقيقة ودرجة حرارة 28ºC لمدة 48 ساعة، حتى وصول تركيز المعلق البكتيري إلى كثافة ضوئية مساوية لـ 1 (OD_{600}=1) تقريباً (~2*10^9 CFU\mL)، ثم أُخذ 20 mL من الوسط السابق، وزُرعت في

1000 mL من الوسط NB نفسه موزعة بالتساوي ضمن 5 دوارق مخروطية بسعة 500 mL، وحُضّنت ضمن الحاضنة الرجاجة وبالشروط السابقة نفسها مدة 48 ساعة، حتى أصبح تركيز البكتيريا في المعلق ثلاثة أضعاف التركيز السابق، ثم ثُفل المعلق البكتيري السابق بسرعة 8000 xg لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة للتخلص من الخلايا البكتيرية، ثم نُقلت الرشاحة الطافية الخالية من الخلايا البكتيرية إلى أوعية مخروطية جديدة، وضُبطت حموضة الوسط حتى أصبحت pH=3.5–3 باستخدام HCL (6N)، ثم أُضيف حجم مماثل من خلات الايثيل إلى الرشاحة السابقة، ومُزجت محتويات الأوعية السابقة لمدة 15 دقيقة في الحاضنة الرجاجة عند درجة حرارة 28 ºC والسرعة 200 دورة /دقيقة حتى تمام التجانس، ثم ثُفلت بسرعة 8000 xg لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة، وجُمع المحلول العضوي الطافي (خلات الايثيل الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF)، ونُقل إلى أنابيب زجاجية جديد بسعة 10 mL، ثم بُخّرت خلات الإيثيل بواسطة حمام مائي عند درجة حرارة 40 ºC، حتى تمام الجفاف، وحُفظت خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF عند درجة حرارة –20ºC لحين الاستخدام.

2-4-تحضير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF للتجارب:

أُتبعت طريقة (Kakkar وآخرون، 2015)، فحُلّت الإشارة النقية الـ DSF (Sigma90%≤) وخلاصة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بواسطة 20% ميثانول Methanol في ماء مقطر لتحضير تراكيز أساسية (1 mM، 20 mg\mL) على التوالي، ثم مددت بالماء المقطر أو بالبيئة NB حتى الحصول على التراكيز المطلوبة للتجارب المنفذّه، ويُضاف إلى الشاهد لكل تجربة أيضاً 1% ميثانول. **وقسمت التجارب إلى قسمين: القسم الأول:** درسُت تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 في عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا XcmS101 مخبرياً، **والقسم الثاني:** دُرست تأثيرهما في نبات القطن (القدرة على الإنبات، وفي ردود الفعل الدفاعية).

مواد وطرائق العمل

2-5-تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا Xcm S101:

يهدف هذا الفصل إلى دراسة مدى سيطرة وتحكم إشارات عائلة الـ DSF على الوظائف البيولوجية للبكتيريا XcmS101 كالنمو والبقاء، والحركة، وإنتاج البروتياز والسكريات المعقدة الخارجية، وتشكل الـ Biofilm، من خلال تحضين البكتيريا المدروسة في وسط نمو يحتوي على تراكيز عالية اصطناعياً ومسبقاً من الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF.

2-5-1-النمو والبقاء:

هدفت التجربة إلى دراسة تأثير كلاً من الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا Xcm S101 على البقاء (تأثيرها على الاستجابات والتغيرات التي تحدث بين الخلايا البكتيرية في البيئة بفعل الـQS كتنظيمها لتشكل Biofilm لحمايتها من الظروف غير المناسبة) في الوسط الفقير (ماء مقطر + كربونات الكالسيوم 0.05 mM) والنمو (تأثيرها على الكثافة العددية للبكتيريا) في الوسط المغذي NB، وأُتبعت طريقة Wiegand وآخرون (2008) مع بعض التعديلات، حيث حُضَرت 10 أنابيب زجاجية سعة 10 mL، 5 أنابيب منها احتوت على 5 mL من الوسط المغذي والـ 5 الأخرى احتوت على 5 mL من الوسط الفقير، احتوت 4 أنابيب من كل وسط على تراكيز مختلفة من الخلاصة البكتيرية mg\ml (0.25، 0.5، 1.25، 7.5)، والباقي لم تحتو كشاهد، أُضيفت إلى الأنابيب الـ 10 السابقة 20 µL من معلَق بكتيري كثيف ذي كثافة ضوئية مساوياً لـ 1 (OD_{600}=1) تقريباً (~$2*10^9$ CFU\mL)، ثم حُفظت الأنابيب الزجاجية الحاوية على الوسط الفقير عند درجة حرارة 4C° (بهدف عدم زيادة أعداد الخلايا البكتيرية) والأنابيب الزجاجية الحاوية على الوسط المغذي ضمن الحاضنة الرجاجة عند درجة حرارة 28C° وسرعة 200 دورة/ دقيقة (بهدف زيادة أعداد الخلايا البكتيرية) لمدة (0، 3، 6، 24، 48، 72) ساعة، دُرست خلال هذه الفترات تأثير الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا على النمو والبقاء حيث أُجريت تعداد بكتيري بعد إجراء تمديدات مختلفة (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-}

مواد وطرائق العمل

10^{-3}،....، 10^{-8})، ثم أخذ 10 µL من كل أنبوب سابق ووضعت على أطباق NA، وحُضنت الأطباق السابقة ضمن الحاضنة عند درجة حرارة 28°C حتى ظهور المستعمرات البكتيرية، ولكل معامل 3 مكررات (أطباق) بالإضافة إلى الشاهد، وللتأكد من أن إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط الزرع البكتيري Xcm S101 هي المؤثرة في نمو البكتيريا Xcm S101 في الوسط المغذي وبقائها في الوسط الفقير، أُعيدت التجربة باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة µM (10، 50، 100) من الإشارة النقية الـ DSF (≤ 90% Sigma) فضلاً عن التركيزين mg\mL (0.5، 1.25) من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، واتبعت الخطوات السابقة نفسها في طريقة تحضير الأنابيب والتحضين وشروطه.

2-5-2-الحركة:

هدفت التجربة إلى دراسة تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا على الحركة مخبرياً، فحُضر معلق بكتيري ذو كثافة ضوئية مساوياً لـ 0.3 (OD_{600}=0.3) تقريباً CFU\mL (~$6*10^8$)، أُخذ منها 3 µL تقريباً، ووُضعت في منتصف أطباق بتري حاوية على وسط (NB + 0.3% Agar) مُضافاً إليها مُسبقاً تراكيز مختلفة من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF mg\ml (0.25، 0.5، 1.25) بمعدل 3 مكررات لكل تركيز فضلاً عن الشاهد الذي لم يضف إليه أي تركيز، حسب طريقة An وTang (2018)، ثم حُضنت الأطباق السابقة عند درجة حرارة 28Cº لمدة (24، 48، 72، 96) ساعة، وأُخذت القراءات يومياً بقياس قطر انتشار البكتيريا في الوسط مقارنة مع الشاهد، وللتأكد أنَ إشارات عائلة DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 هي المؤثرة في تنظيم حركة البكتيريا Xcm S101 في الوسط الغذائي، أُعيدت التجربة باستخدام التركيزين µM (10، 50) من الإشارة النقية الـ DSF (≤ 90% Sigma) فضلاً عن استخدام التركيز 0.5 mg\mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF ، واتبعت الخطوات السابقة نفسها في تحضير الأطباق والتحضين وشروطه.

مواد وطرائق العمل

2-5-3-إنتاج أنزيم البروتياز:

هدفت التجربة إلى دراسة تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا على إنتاج أنزيم البروتياز Protease مخبرياً، حيث أُتبعت طريقة (Wang وآخرون، 2004؛ Fouhy وآخرون، 2007) مع بعض التعديلات، حُضّرت 4 أنابيب زجاجية حاوية على معلق بكتيري بكثافة ضوئية مساوياً لـ 0.6 (OD_{600}=0.6) تقريباً CFU (~$9*10^8$) في 5 mL من الوسط NB، 3 من الأنابيب السابقة احتوت على تراكيز مختلفة من الخلاصة البكتيرية على إشارات عائلة الـ DSF (0.25، 0.5، 1.25) mg\mL، والرابع لم يحتو على أي تركيز كشاهد، حُضّنت الأنابيب السابقة عند الدرجة 28ºC مع الرَج على سرعة 200 دورة/ دقيقة لمدة 4 ساعات، أُخذ 5 µL من المعلقات السابقة، ووُضعت على أطباق NA مزودة بـ 1% حليب منزوع الدسم بمعدل 3 مكررات لكل معاملة (3 أطباق) بالإضافة إلى الشاهد، وحُضنت الأطباق السابقة عند درجة حرارة 28 ºC لمدة (24، 48، 72، 96، 120) ساعة، وقيست الفعالية الأنزيمية بقياس قطر الهالة الشفافة المحيطة باللطاخة البكتيرية، بالاعتماد على قدرة هذا الأنزيم على تفكيك بروتين الحليب.

2-5-4-إنتاج السكريات المعقدة الخارجية:

هدفت التجربة إلى دراسة تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا على إنتاج السكريات المعقدة الخارجية مخبرياً، وأُتبعت طريقة He وآخرون (2010)، فحُضّر معلق بكتيري من العزلة البكتيرية Xcm S101 بحجم 1 mL وبكثافة ضوئية مساوياً لـ 1 (OD_{600}=1) تقريباً (CFU\mL$10^9$*2) أُخذ منها 800 µL من المعلق السابق، ووُزعت بالتساوي ضمن 8 أنابيب زجاجية، 4 أنابيب منها حاوية على 5 mL من البيئة السائلة NB التي تعطي إنتاجاً عالياً من إشارات عائلة الـ DSF، (بهدف دراسة التأثير على إنتاج الـ EPS ضمن وسط منتج لعائلة الـ DSF)، و4 أنابيب زجاجية حاوية على5 mL من البيئة السائلة XLON (0.07% K_2HPO_4، 0.02% KH_2PO_4، 0.1% $(NH_4)_2SO_4$، 0.01% $MgCl_2$، 0.001% $FeSO_4$، 0.0001% $MnCl_2$، 0.2% Sucrose، 0.0625% Trypton، 0.0625%Yeast Extract)، والتي

تعطي إنتاجاً منخفضاً من إشارات عائلة الـ DSF (بهدف دراسة تأثير إضافة الخلاصة على إنتاج الـ EPS ضمن وسط منخفض الإنتاج لـ DSF)، 3 أنابيب من كل وسط احتوت على تراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF mg\mL (0.25، 0.5، 1.25)، والرابع لم يحتو على أي تركيز كشاهد، حُضَنت الأنابيب السابقة عند درجة حرارة 28Cº وسرعة 200 دورة/ دقيقة لمدة 24 ساعة، ثمَ ثُفلت المعلقات البكتيرية السابقة للتخلص من الخلايا البكتيرية، وأُضيف إلى الرشاحات البكتيرية الناتجة كلور البوتاسيوم بتركيز نهائي 1% (v/w)، وحجمان من الإيثانول المطلق إلى الرشاحة البكتيرية، وحُفظ الخليط السابق عند الدرجة 20ºC− طول الليل، ثم رسبت السكريات المعقدة الخارجية بالتثفيل عند سرعة 10000 xg لمدة 10 دقائق عند الدرجة 4 Cº، وحسبت كمية الـ EPS المُنتجة بتجفيف العينات السابقة عند الدرجة 55 ºC لمدة 24 ساعة وحُسبت الأوزان.

2-5-4-تشكل الـ Biofilm:

هدفت التجربة إلى دراسة تأثير خلاصة وسط زرع البكتيري Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا Xcm S101 في تشكل الـ Biofilm مخبرياً، حيث أُتبعت طريقة (Deng وآخرون 2014؛ وCai وآخرون 2017) مع بعض التعديلات، حُضَرت 4 أنابيب زجاجية احتوت على معلق بكتيري بكثافة ضوئية مساوياً لـ 0.01 (OD_{600}=0.01) في 5 mL من الوسط NB، 3 من الأنابيب السابقة احتوت على تراكيز مختلفة من الخلاصة البكتيرية على إشارات عائلة الـ DSFI (0.25، 0.5، 1.25) mg\mL، والرابع لم يحتو على أي تركيز كشاهد، حُضَنت الأنابيب السابقة عند الدرجة 28ºC مع الرَج على سرعة 200 دورة/ دقيقة لمدة 24 ساعة حتى وصول الكثافة الضوئية للشاهد لـ 0.1 (OD_{600}= 0.1)، وُزَعت محتويات الأنابيب السابقة ضمن لوح (96 خلية) من بولي ستيرين Polystyrene، بمعدل 200 µL في كل خلية، ثم حُضَن اللوح (96 خلية) عند درجة حرارة 28Cº وسرعة 150 دورة/ دقيقة لمدة 24 ساعة، ثم أُزيلت محتويات اللوح السابق بهدوء، وصُبغت بواسطة 200 µL من الكريستال البنفسجي (1%) لمدة 20 دقيقة، ثم غُسلت خلايا اللوح بالماء المقطر وجُفِّفت، وأُخذت الصور المناسبة، وحُددت كمية الـ Biofilm بإضافة 200 µL من الإيثانول (95 %) إلى خلايا اللوح السابق لإذابة الـ Biofilm

(الذي تحول إلى اللون الأزرق)، أُخذ محتويات 5 خلايا التي تعادل (1 mL) وقيست امتصاصيته على طول الموجة OD_{590}، ولكل معاملة 3 مكررات فضلاً عن الشاهد، وللتأكد من أنَ إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm هي المؤثرة في تشكيل الـ Biofolm، أعيدت التجربة باستخدام التركيزين µM (10، 50) من الإشارة النقية الـ DSF (≤ 90% Sigma) فضلاً عن التركيز 0.5 mg\mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، واتبعت الخطوات السابقة نفسها في تحضير الأنابيب واللوح والتحضين وشروطه.

2-6-تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في النبات العائل:

يهدف هذا الفصل إلى دراسة تأثير إشارات عائلة الـ DSF في النبات العائل (القطن) من خلال معاملة نبات القطن بالإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF إما بطريقة نقع البذور بهدف دراسة التأثير على القدرة الإنباتية لبذور القطن، والحد من الشدة المرضية للبكتيريا المدروسة في الأوراق الحقيقية، وعلى فعالية أنزيم البيروكسيداز، أو من خلال معاملة الأوراق الفلقية إما بطريقة الحقن بهدف دراسة التأثير على تطور نمو البكتيريا المدروسة في الأنسجة النباتية، وعلى تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين، والموت الخلوي المبرمج، أو بطريقة الرش لدراسة فعالية أنزيم البيروكسيداز.

2-6-1-قدرة بذور القطن على الإنبات:

دُرس تأثير الإشارة النقية DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشـــارات عائلة الـ DSF على قدرة بذور القطن صنف حلب 33 على الإنبات، وأُتبعت طريقة (Amruthesh وآخرون، 2005؛ Xie وآخرون، 2014) في تعقيم البذور مع بعض التعديلات، فعُقمت بذور القطن صنف حلب (33) بواسطة هيبوكلوريد الصوديوم (1.5%) لمدة دقيقتين للتخلص من أي حمولة بكتيرية أو فطرية على سطح البذور، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات للتخلص من الأثار المتبقية من هيبوكلوريد الصودوم، ثم نُقعت بذور القطن صنف حلب 33 بالتركيز µM 100 من الإشارة النقية DSF (≤ 90% Sigma) أو بتراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا

Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF mg\mL (0.25، 0.5، 1.25) أو في الماء المقطر كشاهد لمدة 6 ساعات بمعدل 60 بذرة لكل معاملة إضافة إلى الشاهد، ثم وُضعت بين ورقتي نشاف مشربة بالمعاملات المذكورة أعلاه، وبمعدل 20 بذرة في كل طبق وبطريقة القطاعات العشوائية الكاملة، حُضنت الأطباق السابقة ضمن الحاضنة النباتية عند درجة حرارة 28ºC ورطوبة 80% لمدة 3 أيام، وحُسبت النسبة المئوية لإنبات البذور وفق المعادلة التالية

(1): نسبة الإنبات % = (عدد البذور المُنبتة/ عدد البذور في التجربة) *%100. (1)

وحللت النتائج بواسطة برنامج التحليل الإحصائي SPSS عند مستوى معنوية 1% للتجارب المخبرية.

2-6-2-الحد من الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية لبنات القطن:

أُتبعت طريقة (Amruthesh وآخرون، 2005؛ Xie وآخرون، 2014) في تحضير البذور مع بعض التعديلات، فبعد إنبات البذور ضمن أطباق التحضين السابقة، نُقلت إلى أصص بسعة 1 كغ حاوية على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، وحُضنت ضمن البيت الزجاجي (8/16 ساعة ضوء/ ظلام، 28°C وبرطوبة 80% نسبياً)%، وبعد ظهور الأوراق الحقيقية للنباتات **قسمت الأصص إلى قسمين؛ القسم الأول:** أُجري عليها عدوى اصطناعية وفق (Martinez وآخرون، 2000) بطريقة الحقن بسرنغ منزوعة الإبرة بمعلق بكتيري ذي تركيز OD_{600}=0.1 تقريباً CFU\mL (10^8*2) بمعدل 4 أصص لكل معاملة فضلاً عن الشاهد، وحضنت الأصص بنفس الشروط السابقة ثم قورنت الشدة المرضية بين نباتات الشاهد والنباتات المُعاملة بعد 10 أيام من ظهور الأعراض المرضية. **أما القسم الثاني:** أجريت عليها عـدوى اصطناعية وفق (Martinez وآخرون، 2000) بطريقة الرش بمعلق بكتيري ذي تركيز OD_{600}=0.1 تقريباً CFU\mL (10^8*2~3-) فضلاً عن الشاهد، وقسمت بطريقة القطاعات العشوائية الكاملة إلى 3 قطاعات وكل قطاع يحتوي عدداً من المعاملات مساوياً لعدد التراكيز المستخدمة بالإضافة إلى الشاهد وكل معامل يتضمن 10 مكررات نباتية، وحضنت الأصص بنفس الشروط السابقة، وقورنت الشدة المرضية بين نباتات المعاملة والشاهد بعد 10 أيام من ظهور الأعراض المرضية، ثم قُيمت شدة المرض حسـب مقياس تصنيف المرض لـ (Poswall وErinle، 1983) وفق ما يلي: 0 = لا توجد بقع مائية؛ 1= بقعة أو بقعتان مائيتان أقطارهما

لا تتجاوز 0.5 mm؛ 2= عدد قليل من البقع المائية أقطارها بين 0.5–0.2 mm غير مندمجة؛ 3= عدد من البقع المائية أقطارها ≥ 2mm متجمعة في بعض الأحيان ولكن لا توجد اصفرار على الفلقات؛ 4= عدد من البقع المائية أقطارها بين 4–3 mm متكتلة مع بعضها مع اصفرار الفلقات وبعضها يتحول إلى اللون البني؛ 5= بقع كبيرة الحجم قطرها ≥ 5 mm مندمجة مع بعضها اندماجاً واسع مع اصفرار النبات وتماوت الفلقات. وحُسبت الشدة المرضية لكل من الشاهد والنباتات المُعاملة بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF وفق المعادلة (Wheeler وآخرون، 1969) التالية **(2)**:

النسبة المئوية لشدة الإصابة = (مجموع عدد النباتات المصابة* درجة تصنيفها) / درجة أعلى تصنيف* عدد النباتات الكلية (2)

وحلّلت النتائج باستخدام برنامج التحليل الإحصائي SPSS عند مستوى معنوية 5% للتجارب ضمن البيت الزجاجي.

2-6-3-الحد من نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية لبنات القطن:

دُرس تأثير كل من الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الحد من تطور نمو البكتيريا في الأوراق الفلقية لبنات القطن، حيث عوملت بذور القطن صنف حلب (33) بحمض الكبريت التجاري لمدة دقيقة للتخلص من الألياف القطنية ومن أي حمولة بكتيرية أو فطرية على سطح البذور، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاثة مرات للتخلص من الأثار المتبقية من حمض الكبريت التجاري، **قُسمت البذور بعد ذلك إلى قسمين، القسم الأول:** نُقعت بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100 µM أو بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5 mg\mL أو في الماء المقطر شاهداً لمدة 6 ساعات حسب طريقة (Amruthesh وآخرون، 2005؛ Xie وآخرون، 2014) وتعديلاتها، ثم نقلت البذور إلى أصص بسعة 1 كغ حاوية على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، ولكل معاملة 4 أصص إضافة إلى الشاهد، وحُضنت الأصص ضمن البيت الزجاجي عند (8/16 ساعة ضوء/ ظلام، 28°C وبرطوبة 80% نسبياً) وبعمر 10 أيام للأوراق الفلقية أجريت عليها عدوى اصطناعية بطريقة الحقن بإبرة منزوعة السرنغ بمعلق بكتيري ذي كثافة ضوئية (OD_{600}=0.1) ما يقارب CFU\mL (10^8* 2) لكامل سطح الورقة الفلقية.

مواد وطرائق العمل

أما القسم الثاني من البذور: نقلت مباشرة إلى أصص بسعة 1 كغ حاوية على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص. وحُضنت الأصص ضمن البيت الزجاجي عند (8/16 ساعة ضوء/ ظلام، 28°C وبرطوبة 80% نسبياً) وبعمر 10 أيام للأوراق الفلقية، **قسمت النباتات إلى قسمين؛ القسم A**: حقنت بالإشارة النقية DSF بتركيز 100 µM أو التركيز 0.5 mg\mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو بالماء المقطر كشاهد بمعدل 4 أصص لكل معاملة (16 نبات لكل معاملة) إضافة إلى الشاهد، وبعد 24 ساعة من التحضين أجريت عليها عدوى اصطناعية بطريقة الحقن بإبرة منزوعة السرنغ بمعلق بكتيري ذو كثافة ضوئية (OD_{600}=0.1) ما يقارب ($2*10^8$ CFU\mL) لكامل سطح الورقة الفلقية، **أما القسم B**: حُقنت بواسطة إبرة منزوعة السرنغ بمعلق حاوي على البكتيريا Xcm S101 بكثافة ضوئية (OD_{600}=0.1) ما يقارب ($2*10^8$) CFU\mL مع الإشارة النقية DSF بتركيز 100 µM أو التركيز 0.5 mg\mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الماء المقطر كشاهد، بمعدل 4 أصص لكل معاملة (16 نبات لكل معاملة) إضافة إلى الشاهد، ثم حُضِّنت الأصص السابقة ضمن البيت الزجاجي عند (8/16 ساعة ضوء/ ظلام، 28°C وبرطوبة 80% نسبياً).

وقيم النمو البكتيري في الأنسجة النباتية خلال 10 أيام للنباتات المعاملة بذرورها والنباتات التي حُقنت مسبقاً بالمعاملات المدروسة، و5 أيام للنباتات التي حُقنت بالمعلق الحاوي على المعاملات والبكتيريا Xcm S101 بتقنية عد الصفائح حسب طريقة (Marmery وآخرون، 2007)، حيث جُمعت خمسة أقراص باستخدام مسبار حديدي ذي قطر 0.56 Cm، وعُقمت بالكحول 75% لمدة دقيقتين وغُسلت بالماء المقطر المعقم مرتين للتخلص من أثار الكحول، وسُحقت في 5 mL من الماء المقطر المعقم باستخدام هاون معقم، ثم خُفف المعلق عدة تخفيفات (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7}) بالماء المقطر المعقم، ثمّ أُخذ 10 µL من كل تخفيف ووُضعت على أطباق NA وحُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28ºC لمدة 48 ساعة، ثم حُسب التعداد البكتيري في الفلقات المعداة، وعُبَر عنه في الأنسجة بـ log10 CFU\Cm^2. كُررت التجربة ثلاث مرات دُرس من خلالها تأثير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة DSF على تطور البكتيريا Xcm S101 مقارنة مع الشاهد.

مواد وطرائق العمل

2-6-4-تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وبرنامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية لنبات القطن.

هدف البحث إلى دراسة تأثير كل من الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF على تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وبرامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية لنبات القطن، حُقنت الأوراق الفلقية لنباتات القطن بعمر 10 أيام لنباتات القطن بواسطة سرنغ منزوعة الإبرة بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100 µM أو بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5 mg\mL بالماء المقطر كشاهد لكامل سطح الورقة الفلقية، وبعد 24 ساعة من الحقن أخذ قسم من النباتات بهدف الكشف عن تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في الأنسجة النباتية المُعاملة باستخدام صبغة 3`3- Diaminobenzidine (DAB) بتركيز 1 mg\mL (ماء مقطر) حسب طريقة Daudi وآخرون (2012)، فوُضعت الأوراق الفلقية ضمن أطباق بتري حاوية على الصبغة DAB ووُضعت الأطباق ضمن حاضنة رجاجة عند سرعة 80 دورة/ دقيقة ودرجة حرارة 25°C لمدة 6 ساعات، ثم نقلت الأوراق الفلقية إلى أطباق بتري جديدة حاوية على محلـــول إزالة الكلوروفيل (ايثانول: حمض اللاكتيك: غليسيرول) بنسبة 1:1:3، ولمدة 24 ساعة وبعد إزالة الكلوروفيل، نُقلت الأوراق إلى سطح ذي خلفية بيضاء وأُخذت الصور، بمعدل 4 نباتات لكل معاملة بالإضافة إلى الشاهد. بينما كُشف عن موت الخلايا المبرمج من خلال صبغة أزرق لاكتوفينول تريبان بتركيز 10 mg\mL حسب طريقة Bautista وآخرون (2016)، حيث أُخذ القسم الأخر من النباتات الفلقية، ووُضعت أوراقها ضمن أطباق بتري حاوية على صبغة أزرق لاكتوفينول تريبان وبعد ساعة من التصبَغ، غُسلت الأوراق بالإيثانول (98%) لإزالة بقايا الصباغ، ووُضعت ضمن أطباق بتري حاوي على الإيثانول (98%) طوال الليل، ثم استبدل الإيثانول بآخر جديد حتى أُزيل الكلوروفيل من الأوراق نهائياً، ثم غُمست الأوراق بالغليسيرول 60%، ونُقلت إلى خلفية بيضاء وأُخذت الصور بمعدل 4 نباتات لكل معاملة بالإضافة إلى الشاهد.

مواد وطرائق العمل

2-6-5-فعالية أنزيم البيروكسيداز Peroxidase في الأوراق الفلقية:

2-6-5-1-تحضير الأوراق الفلقية للمعاملات:

أتبعت طريقة (Amruthesh وآخرون، 2005؛ Xie وآخرون، 2014) في معاملة البذور مع بعض التعديلات، وطريقة Martinez وآخرون (2000) في تحضير النباتات للمعاملات المدروسة، وعوملت بذور القطن صنف حلب (33) بواسطة 1% حمض الكبريت لمدة دقيقة للتخلص من الألياف القطنية ومن أي حمولة بكتيرية أو فطرية على سطح البذور، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات للتخلص من الأثار المتبقية من حمض الكبريت التجاري 1%، **ثم قُسمت البذور إلى قسمين؛ القسم الأول** نُقعت في الإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100 µM أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5 mg\mL بالماء المقطر كشاهد لمدة 6 ساعات بمعدل 20 بذرة لكل معامل، ثم نقلت البذور إلى أصص بسعة 1 كغ تحتوي على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، ثم حُضنت الأصص ضمن البيت الزجاجي عند (8/16 ساعة ضوء/ ظلام، 28°C وبرطوبة 80% نسبياً)، وعند وصول الأوراق الفلقية للمعاملات السابقة للعمر 10 أيام جُمعت وحُفظت عند درجة (-20 °C) لحين الاستخدام، **أما القسم الثاني من البذور** زُرعت مباشرة في أصص حاوية على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، وحُضنت الأصص ضمن البيت الزجاجي عند (8/16 ساعة ضوء/ ظلام، 28°C وبرطوبة 80% نسبياً) ، وعند وصول الأوراق الفلقية للعمر 10 أيام رُش قسم منها بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5 mg\mL وقسم آخر بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100 µM، والقسم الأخير بالماء المقطر شاهداً بمعدل 20 نباتياً لكل معامل، ثم جمعت الأوراق الفلقية على أوقات مختلفة (0، 3، 24، 48، 72، 96) ساعة، وحُفظت عند درجة حرارة (-20°C) لحين الاستخدام.

2-6-5-2-تحضير المستخلص الأنزيمي الخام:

أُتبعت طريقة Martinez وآخرون (2000)، وحُضّرت الخلاصة النباتية من خلال طحن 1g من الأنسجة النباتية الأوراق الفلقية والمجمدة عند درجة حرارة (-20°) والمُعاملة بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF

أو بالإشارة النقية DSF أو بالماء المقطر بالطريقتين آنفة الذكر مع 4 mL من محلول الاستخلاص Tric– HCL buffer ذي حموضة pH=7 والمكون من (50mM Tris basic، 50mM NaCl، 5mM β–Mercaptoethanol، 1% PVP، و0.01% Triton 100X). ثم ثُفلت الخلاصة النباتية الخام بواسطة جهاز الطرد المركزي عند سرعة 16000 g لمدة 15 دقيقة ودرجة حرارة 4ºC. وأُخذ القسم العلوي لناتج التثفيل واُستخدمت الخلاصة النباتية الطازجة لدراسة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD بهدف المقارنة بين الشاهد والنباتات المُعاملة، وحُضرت لكل عينة نباتية مدروسة ثلاثة مكررات من الخلاصة الأنزيمية.

2–5–6–3–الفعالية الأنزيمية للبيروكسيداز في خلاصة الأوراق الفلقية:

قيمت فعالية البيروكسيداز الـ POD لكل مكرر من العينات المدروسة طيفياً، فأُخذ 5 µL من الخلاصة الأنزيمية لكل مكرر من العينات المدروسة، وقيست الامتصاصية الضوئية عند طول موجة 470 nm، باستخدام محلول التفاعل والمكون من (0.01% غوياكول guaiacol، 0.03% H_2O_2، Sodium Phosphate buffer 50mM ودرجة حموضة pH=6.8، ثم قدر النشاط الكلي لأنزيم البيروكسيداز لكل 1 mL من المستخلص الأنزيمي في البداية بـ (U/mL) باستخدام Guaiacol ركيزة، وفق المعادلة التالية (3):

$$U/mL = (\Delta OD/min * Rmv * df)/£_{470} * EV \quad (3)$$

حيث: ΔOD هي التغير في الامتصاصية خلال دقيقة واحدة.

Rmv: كمية المستخلص الأنزيمي الداخل في التفاعل. df : عامل التمديد.

$£_{470}$: الامتصاصية المولية لـ Tetraguiacolعند طول الموجة 470 nm **($mL.\mu mol^{-1}.cm-1$)**

EV: كمية المستخلص الأنزيمي الكلي.

ثم حُسبت الفعالية الكلية لأنزيم البيروكسيداز بـ nanoKatal/ mg لكل 1 mg من تركيز البروتين الكلي في الأنسجة النباتية لكل مكرر من العينات النباتية المدروسة، فحُسب تركيز البروتينات الكلية للأوراق الفلقية للنباتات المدروسة بطريقة

برادفورد Bradford (1976)، وذلك من خلال تحضير عدة تراكيز معروفة الوزن من ألبومين مصل البقر، وإنشاء معادلة خط مستقيم، ومن ثم حساب تركيز البروتينات الكلية في المعاملات بناءً على المعادلة الخطية.

2-15-التحليل الإحصائي:

صُممت التجارب بطريقة القطاعات العشوائية الكاملة، ثم حُللت النتائج بواسطة برنامج SPSS عند مستوى المعنوية $p < 0.01$ للتجارب المخبرية، وبمستوى معنوية $p < 0.05$ للتجارب غير المخبرية، بطريقة One-Way Anova.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة Results and Discussion

3-1-القدرة الإمراضية للعزلة Xcm S101:

أظهرت النتائج (الشكل 12) أن العزلة البكتيرية المستخدمة Xcm S101 قد حافظت على قدرتها الإمراضية، حيث ظهرت على السطح السفلي للأوراق الفلقية بقع زيتية مشبعة بالماء (Watersoaking) في مكان حقن المعلق البكتيري للعزلة Xcm S101.



الشكل (12): أعراض البقع الزيتية المائية .Watersoaking الناتجة عن الإصابة بالعزلة XcmS101.

3-2-التأثير في عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا Xcm S101:

3-2-1-النمو والبقاء.

أظهرت النتائج أنَ كلاً من الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط الزرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF دوراً سلبياً في قدرة البكتيريا Xcm S101 على النمو والبقاء، فبدأت أعداد الخلايا البكتيرية الحية بالتناقص بازدياد تركيز كل منهما، ففي الوسط الفقير وعند استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (الشكل A-13) أظهرت النتائج فروقاً معنوية عند المستوى $p<0.01$ بين الشاهد والمعاملات بدءاً من الساعات الأولى من التحضين، فانخفض نمو البكتيريا عند الزمن 3 ساعات من التحضين في المعاملات (0.25، 0.5) mg\mL لوغاريتمياً ما يقارب (0.1، 1) على التوالي مقارنة مع الشاهد، أما المعاملات mg\mL (1.25، 7.5) لم يظهر فيها نمو بكتيري، وعند زمن التحضين 6 ساعات استمر النمو البكتيري بالانخفاض لوغاريتمياً في المعاملة 0.25 mg\mL ما يقارب (0.2)، واستمر النمو بالانخفاض عند هذا التركيز طيلة مدة التحضين دون أن

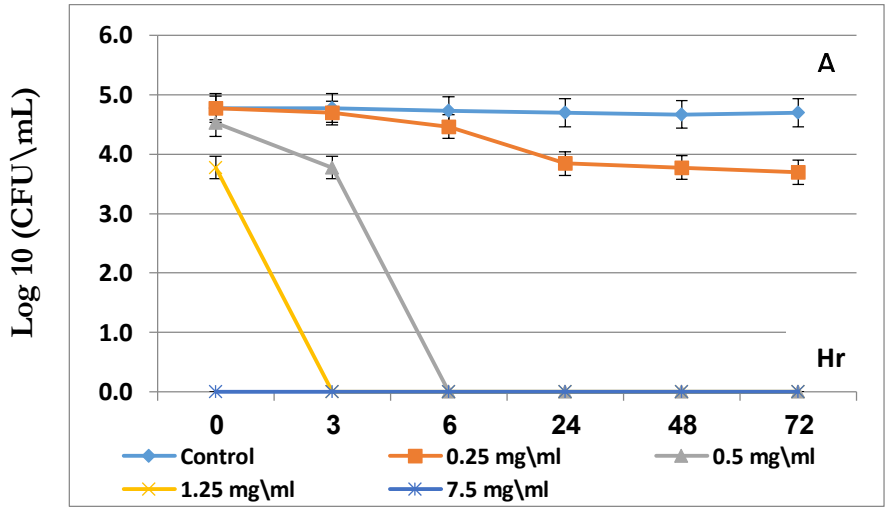
تسبب في موت البكتيريا، أما بقية المعاملات لم يظهر فيها نمو بكتيري، وبالمقارنة مع استخدام الإشارة النقية الـ DSF، أظهرت النتائج (الشكل B–14) فروقاً معنوية بين الشاهد والمعاملات عند مستوى معنوية $p<0.01$ بدءاً من الساعات الأولى من التحضين، فحافظت البكتيريا على كثافتها العددية في المعاملـــة (10 µM) من الإشـــــارة النقية الـ DSF (≤ 90% Sigma) طيلة 6 ساعات من التحضين، قبل أن تبدأ البكتيريا بالانخفاض فانخفض معدل نمو البكتيريا لوغاريتمياً عند زمن التحضين 24 ساعة ما يقارب (0.84) مقارنة مع الشاهد، واستمر نمو البكتيريا في هذه المعاملة بالانخفاض طيلة مدة التحضين دون أن تسبب في موت البكتيريا، بينما سببت بقية المعاملات µM (50، 100) موت البكتيريا بعد (6، 3) ساعات من التحضين على التوالي، وبالتالي تشابهت هذه النتائج مع نتائج استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF. مما يدل على أن كلاً من إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية الـ DSF تؤثر سلبياً في بقاء البكتيريا Xcm S101 على قيد الحياة في الوسط الفقير، وسببت التراكيز المنخفضة 0.25 mg\mL من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات DSF، أو10 µM من الإشارة النقية الـ DSF انخفاضاً في النمو البكتيري دون قتلها مقارنة مع بقية المعاملات التي سببت في قتل البكتيريا. أما في الوسط المغذي وعند استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (الشكل B–13) أظهرت النتائج فروقاً معنوية عند المستوى $p<0.01$ بين الشاهد والمعاملات بدءاً من الساعات الأولى من التحضين، وأدت المعاملـة بالتركيز 0.25 mg\mL من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF إلى انخفاض النمو البكتيري لوغاريتمياً ما يقارب (1، 1.8، 2) خلال مدة التحضين (24، 48، 72) ساعة مقارنة مع الشـــاهد، بينما حافظ التركيز 0.5 mg\mL على التعداد البكتيري طيلة مدة التحضين ولذلك يمكن عد التركيز MIC (الحد الأدنى من تركيز الخلاصة المسببة لتثبيط نمو البكتيريا)، أما التركيز 1.25 mg\mL فقد سبب موت البكتيريا بعد 6 ساعات من التحضين لذلك يمكن عده MBC (الحد الأدنى من تركيز الخلاصة والمسببة لموت البكتيريا)، وبالمقارنة مع استخدام تراكيز مختلفة من الإشارة النقية الـ DSF، بينت النتائج (الشكل A–14) فروقاً معنوية عند المستوى $p<0.01$ بين الشاهد والمعاملات بدءاً من الساعات الأولى من التحضين، فعند استخدام التركيز µM 10 نمت البكتيريا نمواً مطابقاً لنمو الشاهد خلال

النتائج والمناقشة

6 ساعات من التحضين، قبل أن ينخفض النمو البكتيري لوغاريتمياً عند زمن التحضين 24 ساعة بما يقارب (1.26) مقارنة مع الشاهد، ثم حافظت البكتيريا على تعدادها حتى الزمن 48 ساعة من التحضين، قبل أن تبدأ بالتناقص عند الزمن 72 ساعة بما يقارب لوغاريتميا (4.4) مقارنة مع الشاهد، بينما عند استخدام التركيز 50 µM فقد حافظت البكتيريا فيها على كثافتها خلال 24 ساعة من التحضين قبل أن تبدأ بالانخفاض والموت عند زمن التحضين 72 ساعة، وكذلك عند استخدام التركيز 100 µM فقد أدت إلى انخفاض نمو البكتيريا خلال الساعات الأولى من التحضين، ثم سببت موت البكتيريا بعد 24 ساعة من التحضين. وبالتالي فقد تشابهت هذه النتائج مع نتائج استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF. مما يدل على أن كلاً من إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية الـ DSF تؤثر سلبياً في قدرة البكتيريا Xcm S101 على النمو في الوسط المغذي، وهذا ما يمكن استخدامها كعامل مكافحة بيولوجية للبكتيريا، حيث بينت النتائج السابقة أن كثافة البكتيريا الحية تتناقص كلما زادت تركيز الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية، فوُجد أن التركيز 0.25 mg\mL سبب انخفاض نمو البكتيريا مقارنة مع الشاهد دون أن تسبب في قتلها، بينما التركيز 0.5 mg\mL قد ثبط نمو البكتيريا طيلة مدة التحضين، مما قد يدل ذلك على بلوغ إشارات عائلة الـ DSF في هذا التركيز إلى المستوى المطلوب لاستحثاث الـ QS مما أدى إلى توقف البكتيريا عن الانقسام والنمو، بينما التركيزين 1.25 mg\mL و7.5 mg\mL فكان لهما تأثير قاتل للبكتيريا، وعند استخدام الإشارة النقية فكانت النتائج متشابهة في أن التركيز المنخفض 10 µM خفض من نمو البكتيريا مقارنة مع الشاهد مع المحافظة على تعداد نمو البكتيريا لمدة زمنية قبل أن تبدأ البكتيريا بالانخفاض، بينما التركيزان 50، 100 µM فكان لهما تأثير قاتل للبكتيريا ظهرت نتائجها خلال الساعات الأولى من التحضين. تشير الدراسات المرجعية بأن عائلة الـ DSF مسؤولة عن تعبير المورثات الضرورية لاستعمار الوسـط الحي وغير الحي عند البكتيريا المنتجة لها كـ *Xanthomonas* و *Xylella fastidiosa* و*Stenotrophomonas maltophila* وغيرها مـــن البكتيريا (Wang وآخرون، 2004؛ Vojnov وآخرون، 2009؛ Samal وChatterjee، 2020؛ Chatterjee وآخرون، 2008)، ويعزى موت البكتيريا في التراكيز العالية في كل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF

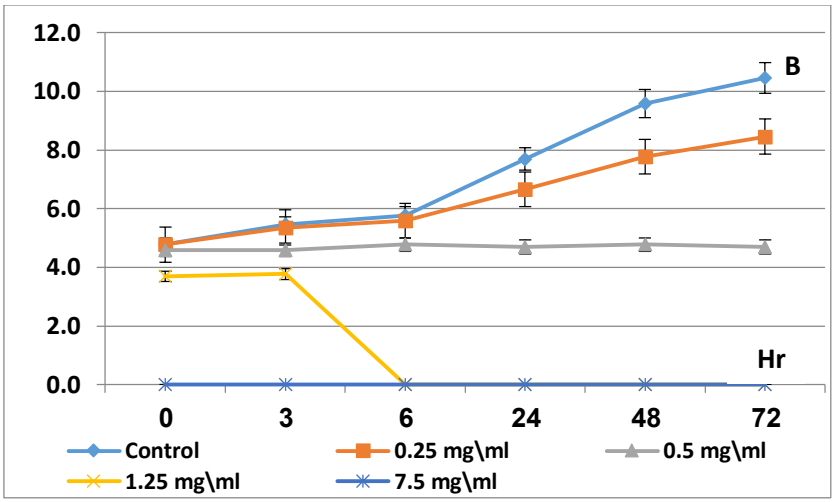
النتائج والمناقشة

إلى عدة أمور منها **أولا:** وجود تراكيز عالية من إشارات عائلة الـ DSF وحموض دهنية أخرى في الخلاصة البكتيرية وكذلك التراكيز العالية من الإشارة النقية الـ DSF لم تستطع البكتيريا Xcm S101 هضمها جميعها الأمر الذي أدى إلى تراكمها في الوسط وبالتالي موت الخلايا البكتيرية بعد مدة قصيرة من الزمن، وأشار Dow وآخرون (2016) إلى قدرة البكتيريا Xcc وXoo على هضم إشارات عائلة الـ DSF في الوسط الذي تعيش فيه عندما يبلغ تركيزها حداً معيناً، وهذا ما يفسر انخفاض النمو كلما زاد تركيز الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الوسط المغذي، وتطابقت هذه النتائج مع Bi وآخروين (2014) الذي أشار إلى أن حدوث طفرتين في المورثتين *RpfB* و*RpfC* للبكتيريا Xcc تؤدي إلى حدوث فرط في إنتاج إشارات عائلة DSF ومشتقات حموض دهنية أخرى إلى الوسط النمو وبالتالي عدم قدرة البكتيريا Xcc على هضم إشارات عائلة DSF و لمشتقات الحموض الدهنية الأخرى أو استقلابها الأمر الذي يسبب ارتفاع تركيزها في الوسط مما يؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا البكتيرية وتحللها، وهذا ما أكده Tian وآخرون (2022) الذي أشار إلى أن المورثة *Rpf* B عند البكتيريا Xcc تقوم بهضم الإشارة BDSF لتجنيب تثبيط نمو البكتيريا بفعل تراكم التراكيز العالية من الإشارة BDSF، وبالتالي تعمل البكتيريا Xcc على تحقيق التوازن بين QS والنمو من خلال التحكم بتركيز الإشارات البكتيرية الكيميائية.



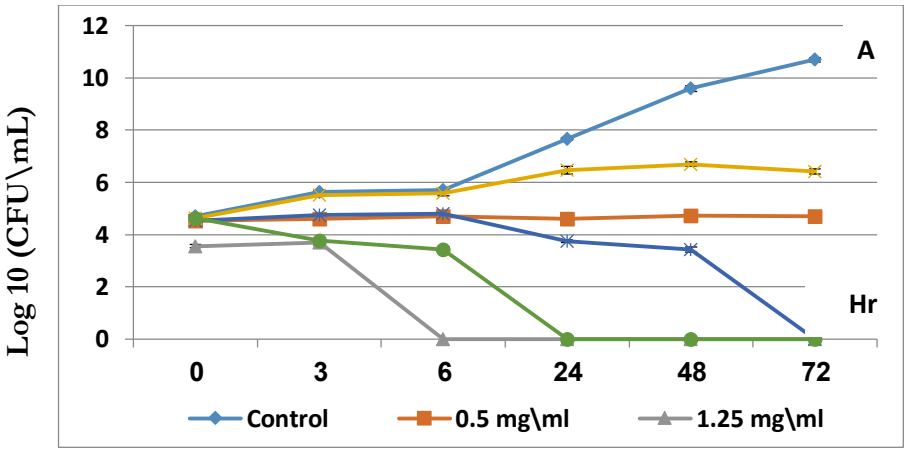
المعاملة/ساعة	Control	0.25 mg\mL	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	7.5 mg\mL	LSD 1%
0	4.8 a	4.8 a	4.5 a	3.8 b	0 c	0.407
3	4.8 a	4.7 a	3.8 b	0 c	0 c	0.522
6	4.7 a	4.5 a	0 b	0 c	0 c	0.34
24	4.7 a	3.8 b	0 c	0 c	0 c	0.32
48	4.7 a	3.8 b	0c	0 c	0 c	0.36
72	4.7 a	3.7 b	0 c	0 c	0 c	0.54

النتائج والمناقشة



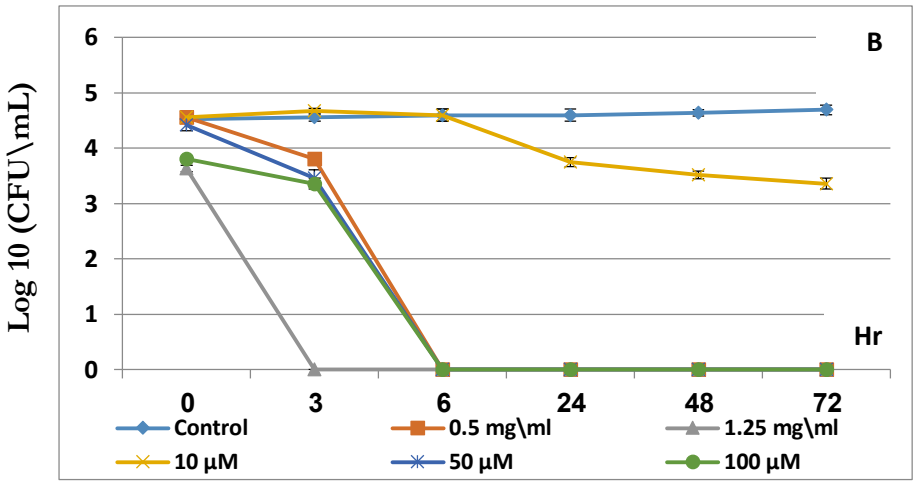
المعاملة/ ساعة	Control	0.25 mg\mL	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	7.5 mg\mL	LSD 1%
0	4.8 a	4.8 a	4.6 a	3.7 b	0 c	0.34
3	5.5 a	5.4 a	4.6 b	3.8 c	0 d	0.315
6	5.8 a	5.6 a	4.8 b	0 c	0 c	0.37
24	7.7 a	6.7 b	4.7 c	0 d	0 d	0.25
48	9.6 a	7.8 b	4.8 c	0 d	0 d	0.213
72	10.5 a	8.5 b	4.7 c	0 d	0 d	0.29

الشكل (13): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا XcmS101: (A): على البقاء في الوسط الفقير، (B) النمو في الوسط المغذي، حُسب التعداد البكتيري في الوسطين لوغاريتمياً مروراً مع الزمن، تشير الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.



المعاملة/ ساعة	Control	10 µM	50 µM	100 µM	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	LSD 1%
0	4.7 a	4.6 a	4.5 a	4.6 a	4.5 a	3.56 b	0.36
3	5.6 a	5.5 a	4.8 b	3.8 c	4.6 b	3.7 c	0.38
6	5.7 a	5.6 a	4.8 b	3.4 c	4.7 b	0 d	0.406
24	7.7 a	6.4 b	3.8 c	0 d	4.6 e	0 d	0.408
48	9.6 a	6.7 b	3.4 c	0 d	4.7 e	0 d	0.368
72	10.6 a	6.4 b	0 c	0 c	4.7 d	0 c	0.33

النتائج والمناقشة



المعاملة/ ساعة	Control	10 µM	50 µM	100 µM	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	LSD 1%
0	4.6 a	4.6 a	4.4 a	3.8 b	4.6 a	3.6 b	0.36
3	4.56 a	4.7 a	3.5 b	3.4 b	3.8 b	0 c	0.423
6	4.6 a	4.6 a	0 b	0 b	0 b	0 b	0.32
24	4.6 a	3.8 b	0 c	0 c	0 c	0 c	0.28
48	4.6 a	3.5 b	0 c	0 c	0 c	0 c	0.38
72	4.7 a	3.4 b	0 c	0 c	0 c	0 c	0.28

الشكل (14): تأثير الإشارة النقية الـ DSF مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد (ماء مقطر) على قدرة البكتيريا Xcm S101 (A): على النمو في الوسط المغذي، B: على البقاء في الوسط الفقير. حُسب التعداد البكتيري في الوسطين لوغاريتمياً مروراً مع الزمن، تشير الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.

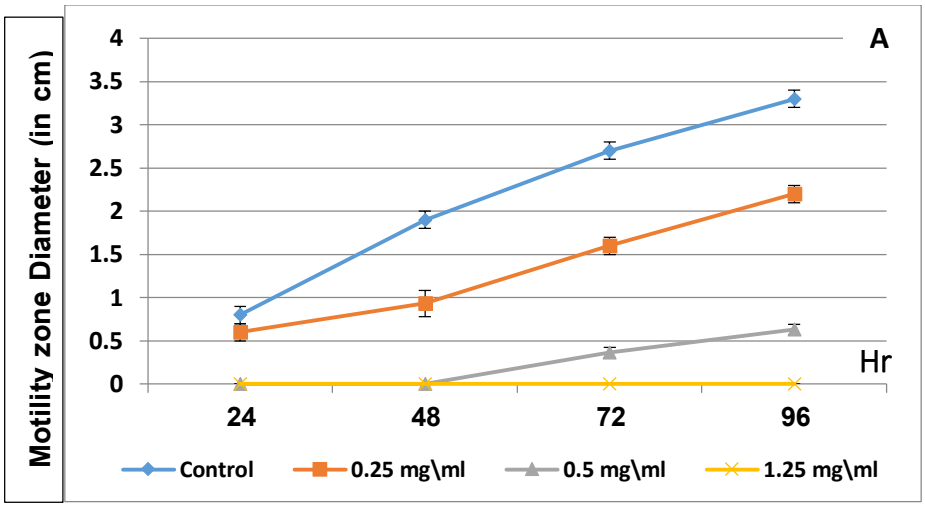
وثانياً كما بيَن Lonsecu وآخرون (2013) إلى أن التركيز العالي من الإشارة البكتيرية XfDSF المتراكمة في الأوعية الخشبية للعنب تسبب في منع الخلايا البكتيرية للبكتيريا *Xylella fastidiosa* من النمو مما يؤدي في النهاية إلى موتها فتوثر الإشارة XfDSF تأثيراً كمضاد فوعة يعمل على تثبيط نمو وحركة البكتيريا، وذكر Chatterjee وآخرون (2008) أن تراكم الإشارة DSF المنتجة من الخلايا البكتيرية داخل الأوعية الخشبية تؤدي إلى تثبيط النمو البكتيري للبكتيريا *Xylella fastidiosa*. **وثالثاً:** كما أكدت الدراسات المرجعية إلى أن وجود مستويات عالية من إشارات عائلة DSF في المرحلة المبكرة من نمو البكتيريا Xcc يمنع من تشكل الـ Biofilm الأمر الذي يعيق بقاء البكتيريا على قيد الحياة (Vojnov وآخرون، 2009). **رابعاً** كما أشارت الدراسات إلى قدرة إشارات عائلة الـ DSF في التحكم في تعبير المورثات المسؤولة عن إنتاج الـ EPS (He وآخرون، 2011) والمسؤولة عن بقاء البكتيريا على قيد الحياة، فيؤدي انخفاض الـ EPS عند البكتيريا *Xanthomonas citri* pv. *axonopodis* (Xac) إلى انخفاض نمو البكتيريا في الوسط المغذي والعائل النباتي، كما ينخفض قدرتها على البقاء على قيد الحياة على سطح العائل النباتي وتنخفض قدرتها الإمراضية (Rigano وآخرون، 2007).

النتائج والمناقشة

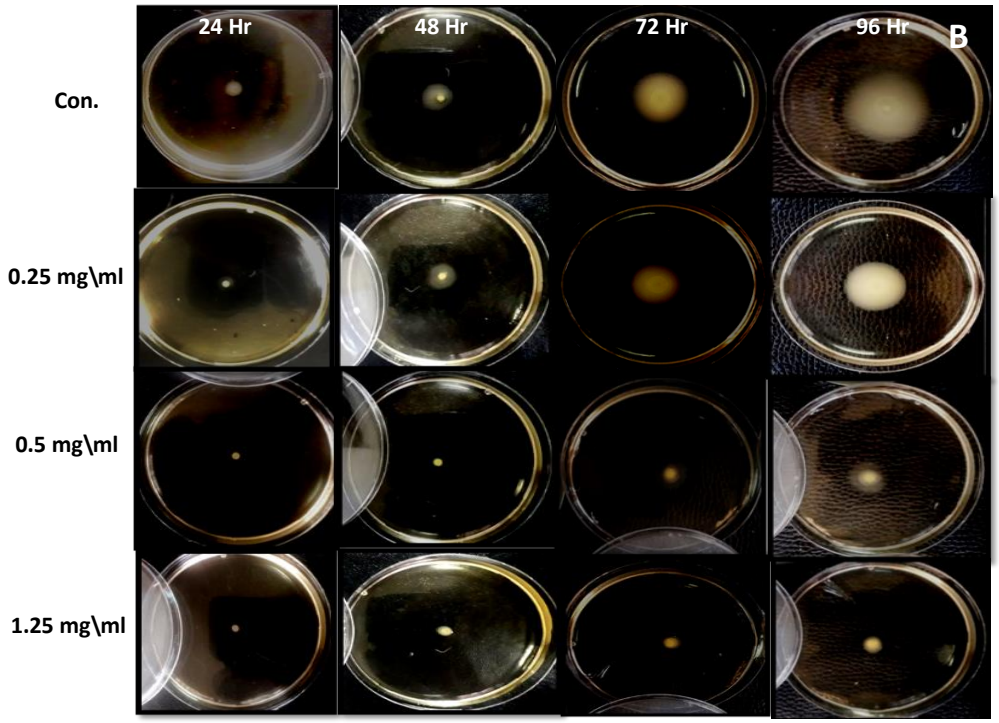
3-2-2-الحركة:

أظهرت النتائج أن كلاً من الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF تؤثران سلبياً في التحكم في حركة البكتيريا، حيث انخفضت حركة البكتيريا كلما زاد تركيز كل منهما، وأظهرت النتائج عند استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (الشكل 15) فروقاً معنوية بين المعاملات والشاهد عند مستوى معنوية $p < 0.01$ بعد 24 ساعة من التحضين، فانخفضت حركة البكتيريا كلما زاد تركيزها ، فعند استخدام التركيز 0.25 mg\mL خُفضت حركة البكتيريا Xcm S101 بنسبة (25، 51، 41، 33) % مقارنة مع الشاهد طيلة فترة التحضين (24، 48، 72، 96) ساعة على التوالي، أما التركيز 0.5 mg\mL قد ثُبطت فيها البكتيريا حركتها خلال مدة التحضين (24، 48) ساعة، أما في الزمن (72، 96) ساعة من التحضين أظهرت البكتيريا حركة ولكنها أقل ما يقارب (86، 81)% مقارنة مع الشاهد، بينما المعاملة 1.25 mg\mL فلم تُظهر فيها البكتيريا أي حركة طيلة مدة التحضين، وتشابهت هذه النتائج مع استخدام الإشارة النقية الـ DSF، حيث بينت النتائج الشكل (16) أنَ التركيز 10 µM ثبط قدرة البكتيريا على الحركة خلال مدة 24 ساعة من التحضين، أما عند الزمن 48، 72 ساعة كانت حركة البكتيريا منخفضة مقارنة مع الشاهد بنسبة (78، 63)% على التوالي، بينما أظهر التركيز 50 µM القدرة على تثبيط حركة البكتيريا طيلة مدة التحضين. مما تشير النتائج السابقة إلى أثر إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية DSF في تنظيم حركة البكتيريا ولكن بشكل سلبي من خلال استهدافها لنظام الحركة عند البكتيريا، وذلك عند استخدام التراكيز المنخفضة من الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية، وبينت النتائج السابقة أنَ التراكيز المنخفضة من الخلاصة البكتيرية 0.25 mg\mL والذي خفض من نمو البكتيريا دون قتلها والتركيز 10 µM من الإشارة النقية الذي خفض من نمو البكتيريا مع المحافظة على الكثافة البكتيرية لمدة زمنية قبل أن تبدأ البكتيريا بالانخفاض قد انخفضت فيها حركة البكتيريا بشكل واضح مقارنة مع الشاهد، أما عند التركيز 0.5 mg\mL والذي وُجد بأنه قد حافظ على كثافة البكتيريا طيلة مدة التحضين قد ثبطت حركة البكتيريا خلال 48 ساعة من التحضين قبل أن تبدأ البكتيريا بالحركة ولكن ببطء مقارنة مع الشاهد، فقد يعود ذلك إلى احتمال تفكك الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الوسط مما أدى إلى انخفاض تركيز إشارات عائلة DSF في الوسط مما قد سمح ذلك بإعادة نشاط QS عند البكتيريا وبالتالي القيام بالحركة.

النتائج والمناقشة

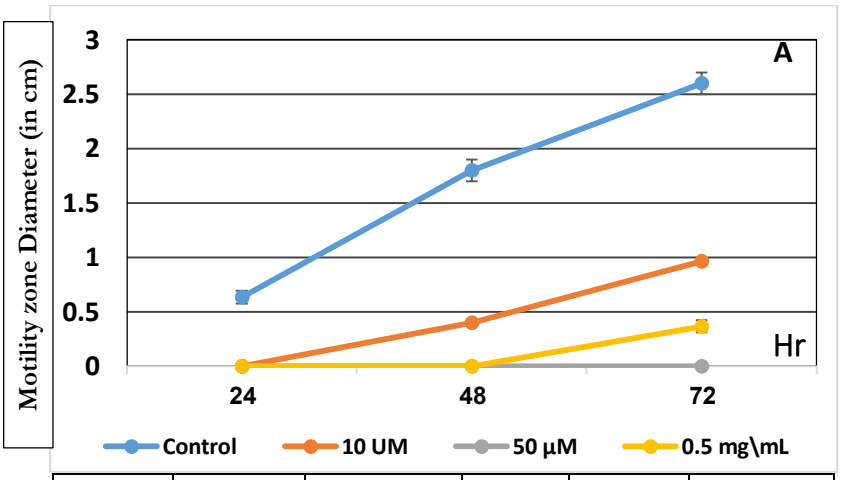


المعاملة/ ساعة	Control	0.25 mg\mL	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	LSD 1%
24	0.8 a	0.6 a	0 b	0 b	0.39
48	1.9 a	0.933 b	0 c	0 c	0.5
72	2.7 a	1.6 b	0.367 c	0 d	0.42
96	3.3 a	2.2 b	0.633 c	0 d	0.42

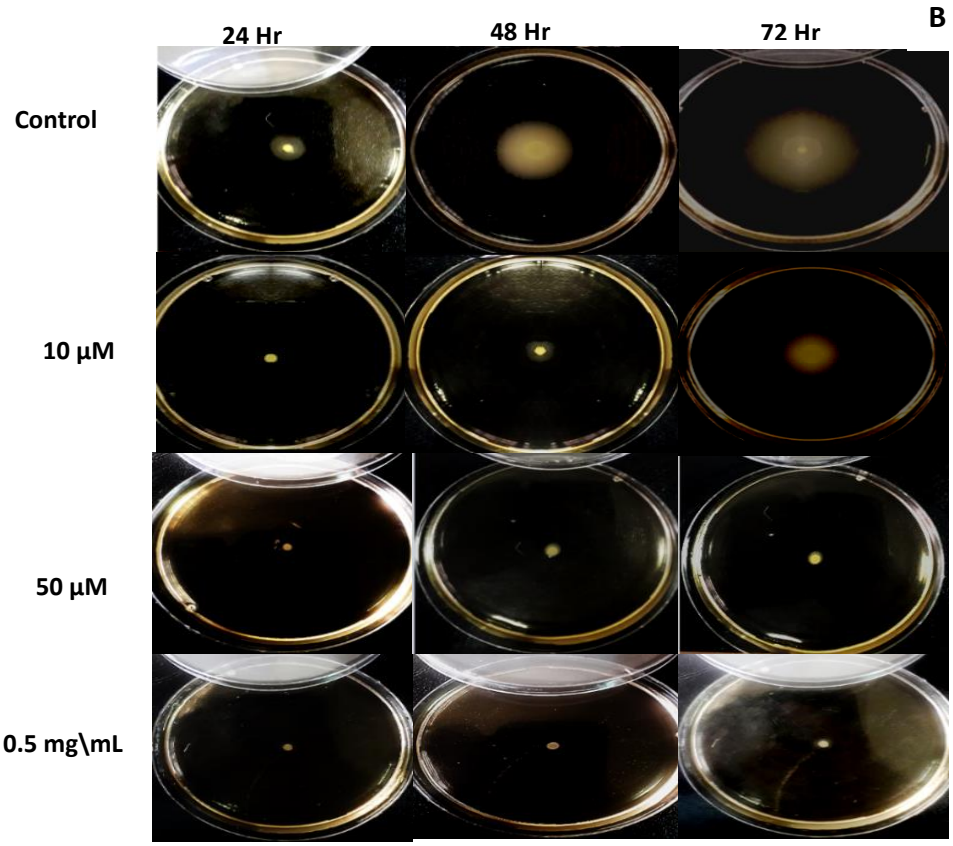


الشكل (15): تأثير إضافة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ Xcm S101 DSF؛ (A) متوسط قطر المستعمرات البكتيرية للمعاملات مقارنة مع الشاهد خلال أربعة أيام من التحضين، (B) صور تمثيلية لهالات الحركة التي شكلتها البكتيريا XcmS101 حول اللطاخة البكتيرية بالنسبة للشاهد والمعاملات بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، تشير الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.

النتائج والمناقشة



المعاملة	Control	0.5 mg\mL	10 µM	50 µM	LSD 1%
24	0.63 a	0 b	0 b	0 b	0.2
48	1.8 a	0 b	0.4 c	0 b	0.35
72	2.6 a	0.36 b	0.96 c	0 d	0.4



الشكل (16): تأثير إضافة الإشارة النقية الـ DSF إلى وسط الحركة شبه الصلب (NB+ Agar 0.3%) ، مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد على حركة البكتيريا Xcm S101 (A): متوسط قطر المستعمرات البكتيرية للمعاملات مقارنة مع الشاهد خلال أربعة أيام من التحضين (B): صورة تمثيلية لهالات الحركة التي شكلتها البكتيريا Xcm S101 حول اللطاخة البكتيرية بالنسبة للشاهد والمعاملات بالإشارة النقية الـ DSF أو الخلاصة البكتيرية، تشير الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.

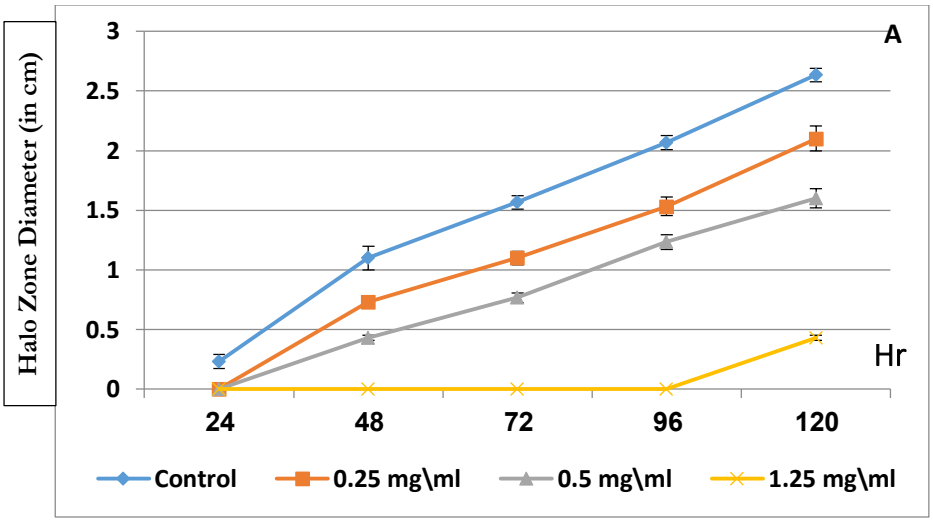
النتائج والمناقشة

أشـارت الدراسات المرجعية إلى أن الحركة عند البكتيريا *Xanthomonas* تقع تحت نظام الـ DSF\QS الذي يعمل على تثبيط حركة البكتيريا في الوسط المحيط عند بلوغ إشارة DSF تركيزاً معيناً في الوسط وتراكمها فيها، ويؤدي تراكم الإشارة الـ DSF في الوسط إلى تثبيط المورثات المسؤولة عن حركة البكتيريا (He وآخرون، 2006؛ Guo وآخرون، 2012؛ Wang وآخرون، 2004)، ومنها المسؤولة عن تشـكيل السـياط الضرورية لحركـة البكتيريا نحو العائل المناسب لها واسـتعمارها له (He وآخرون، 2006). كما أشارت الأبحاث إلى أن إضافة الإشارة الـ DSF إلى وسـط الزرع لكل من *Stenotrophomonas matophilia* و *Xylella fastidiosa* وXoo ثبط من حركتها (An وآخرون، 2018؛ Chatterjee وآخرون، 2008؛ Rai وآخرون، 2012). بينما أشارت دراسات أخرى إلى تحكم الإشارة BDSF في حركة البكتيريا *Burkholderia*. sp (Suppiger وآخرون، 2013). أما التراكيز العالية من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (1.25 mg/mL) أو الإشارة النقية الـ DSF (50 µM)، والتي سببت في تثبيط حركة البكتيريا في الوسط، فيعود سبب ذلك إلى أن التراكيز العالية منهما لم تسمح للبكتيريا بزيادة عددها في وسط النمو نتيجة تأثيرها القاتل للبكتيريا بعد زمن من التحضين كما تبين من نتائج التجارب السابقة من جهة، وتأثيرها على نظام الحركة عند البكتيريا كما أشارت إلى ذلك الدراسات المرجعية آنفة الذكر.

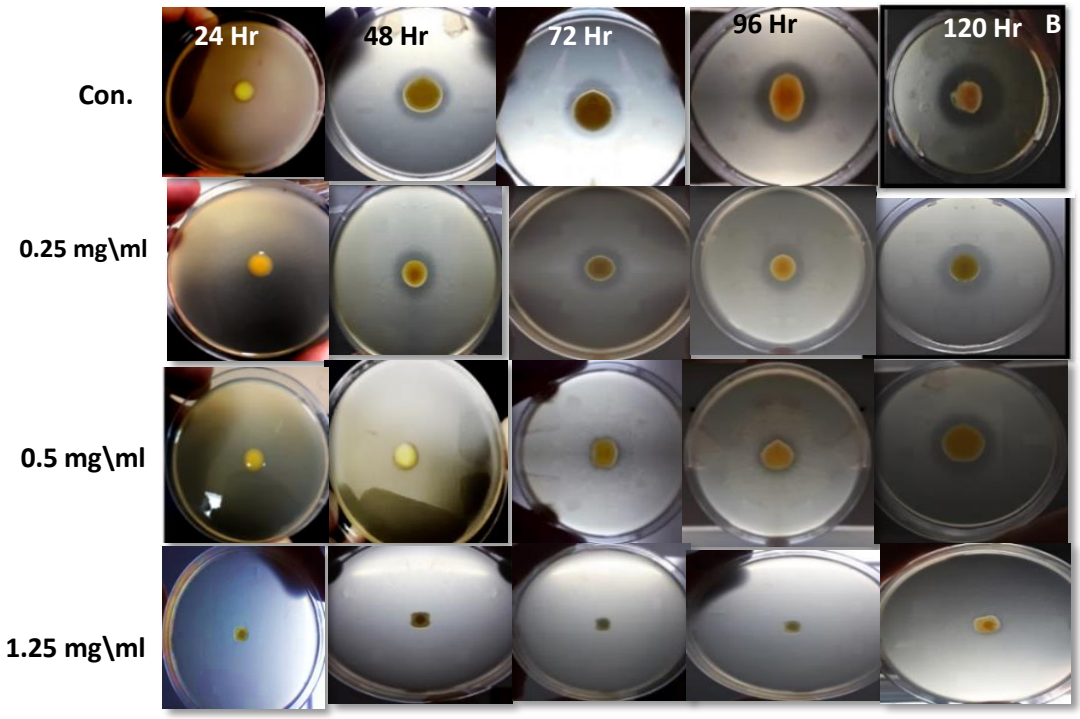
3-2-3-إنتاج أنزيم البروتياز.

أظهرت النتائج أنَ لخلاصة وسط زرع البكتيريا الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أثراً سلبياً في التحكم بقدرة البكتيريا Xcm S101 على إنتاج كل من البروتياز كلما زاد تركيز الخلاصة البكتيرية، حيث تُظهر النتائج (الشكل 17) فروقاً معنوية عند مستوى معنوية $p < 0.01$ بين الشاهد والمعاملات بعد 48 ساعة من التحضين، فلم تنتج البكتيريا المعاملة بالخلاصة البكتيرية أنزيم البروتياز خلال 24 ساعة الأولى من التحضين مقارنة مع الشاهد، ولكن بعد 48 ساعة من التحضين بدأت البكتيريا المعاملة بالتركيزين 0.25 mg\mL، 0.5 من الخلاصة البكتيرية بإنتاج البروتياز ولكن بنسبة أقل بما يقارب (33.4، 61)% مقارنة مع الشاهد، وكان إنتاج البروتياز في المعاملتين السابقتين أقل مقارنة مع الشاهد طيلة مدة التحضين، ووصـل إلى نسـبة ما يقارب (20، 39)% على التوالي مقارنة مع الشاهد عند الزمن 120 ساعة من التحضين، أما المعاملة 1.25 mg\mL لم تنتج فيها البكتيريا لأنزيم البروتياز خلال 96 ساعة من التحضين، ولكن في الزمن 120 ساعة أظهرت فيها البكتيريا إنتاج ضعيف من البروتياز أقل من الشاهد بـ 84%.

النتائج والمناقشة



المعاملة/ ساعة	Control	0.25 mg\mL	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	LSD 1%
24	0.233 a	0 b	0 b	0 b	0.16
48	1.1 a	0.733 b	0.433 c	0 d	0.354
72	1.567 a	1.1 b	0.766 c	0 d	0.354
96	2.067 a	1.533 b	1.233 c	0 d	0.274
120	2.633 a	2.1 b	1.6 c	0.433 d	0.45



الشكل (17): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا Xcm S101 على إنتاج أنزيم البروتياز؛ (A) متوسط قطر الهالة الشفافة حول اللطاخة البكتيرية النامية على أطباق تحتوي (NB +1% حليب منزوع الدسم) خلال 5 أيام من التحضين (B) صورة تمثيلية للهالات الشفافة حول اللطاخة البكتيرية الناتجة عن إنتاج البكتيريا Xcm S101 لأنزيم البروتياز وذلك للشاهد أو المعاملات، تشير الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.

النتائج والمناقشة

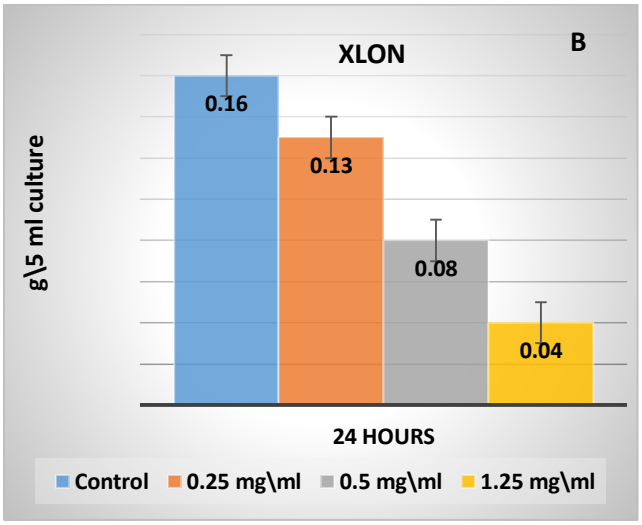
أشارت بعض الدراسات أنَ البكتيريا Xcc و Xoo ذات الطفرة في المورثة *RpfC* التي تعطي كميات فائضة من عائلة DSF انخفض فيها إنتاج البروتياز Protease (He وآخرون، 2006؛ Zhou وآخرون، 2015). وكذلك أشار Siciliano وآخرون (2006) إلى العزلة الطافرة *RpfC* في البكتيريا *Xanthomonas cirti* .pv *citri* التي تعطي إنتاجاً مفرطاً من إشارة الـ DSF أدت إلى انخفاض إنتاج الأنزيمات الخارجية المحللة للجدر الخلوية كالبروتياز. كما تطابقت النتائج مع Torres وآخرون (2007) الذي أشار إلى أن حدوث طفرة في المورثة C *RpfF* عند البكتيريا Xcc8004 أدى إلى زيادة تركيز كل من الإشارات DSF، BDSF في الوسط بما يعادل 16 ضعفاً مقارنة مع النوع البري، الأمر الذي نتج عنه انخفاض الأنزيمات الخارجية. وأشار Wang وآخرون (2016) إلى أن حذف المورثة *RpfB* أدى إلى إنتاج عال من الإشـارة الـ DSF و BDSF عند البكتيريا Xoo PX099A الأمر الذي أدى إلى خفض إنتاج الأنزيمات المحللة الخارجية. ويعزى الإنتاج المنخفض للبروتياز إلى أسباب متعددة منها تأثير إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية على نمو البكتيريا كما تبين سابقاً ، حيث بالمقارنة وُجد أن إنتاج البروتياز كانت منخفضة بشكل يوافق انخفاض كثافة البكتيريا في الوسط، وأنَ وجود إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية مسبقاً قد أثر على توقيت حدوث الـ QS فجعلت البكتيريا تعبر عن عوامل القدرة الإمراضية بشكل مبكر قبل وصولها إلى الكثافة العددية الطبيعية المطلوبة لاستحثاث الـ QS وبالتالي إنتاج عوامل الشراسة فيما يُعرف ذلك بتشويش العامل الممرض Pathogen Confusion كما ذكر ذلك (Caicedo وآخرون، 2017؛ Dow وآخرون، 2016).

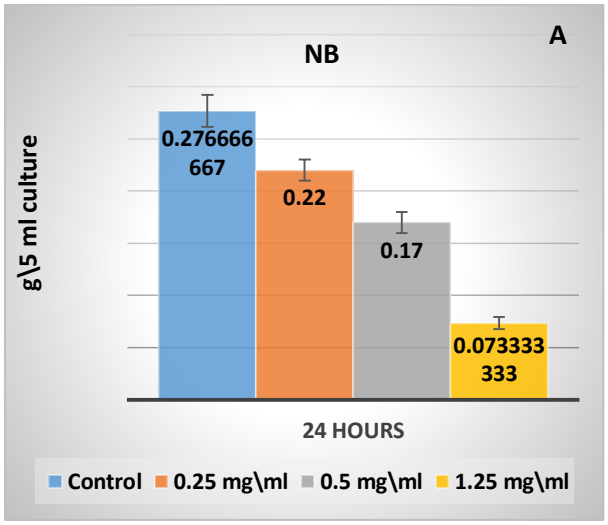
3-2-4-إنتاج السكريات المعقدة الخارجية وتشكل الـ Biofilm:

أظهرت النتائج أنَ لخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF تأثيراً سلبياً على إنتاج السكريات المعقدة الخارجية EPS، حيث انخفضت كمية الـ EPS المُنتجة كلما زاد تركيزها، حيث أظهرت النتائج فروقاً معنوية بين الشاهد والمعاملات عند مستوى معنوية $p<0.01$ في كلا الوسطين NB، XLON بعد 24 ساعة من التحضين، ويُظهر (الشكل A-18) أنَ إضافة تراكيز من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (0.25، 0.5، 1.25) mg\mL إلى الوسط المغذي NB أدى إلى انخفاض كمية الـ EPS المنتجة ما يقارب (20.5، 38.6، 73،5) %

النتائج والمناقشة

مقارنة مع الشاهد، وكذلك الأمر في الوسط XLON (الشكل B–18) الذي انخفض فيها إنتاج الـ EPS في المعاملات (0.25، 0.5، 1.25) mg\mL ما يقارب (18.7، 50، 75) % مقارنة مع الشاهد. أشارت الدراسات المرجعية (Naman وآخرون، 2015) أنَ إنتاج الـ EPS عند البكتيريا Xcm S101 مرتبط بالكثافة البكتيرية وبالتالي انخفاض النمو البكتيري الناتج عن إشارات عائلة الـ DSF يؤدي إلى انخفاض الـ EPS.





المعاملة/ ساعة	Con	0.25 mg\mL	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	LSD 1%
24	0.16 a	0.13 b	0.08 c	0.04 d	0.08

المعاملة/ ساعة	Con	0.25 mg\mL	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	LSD 1%
24	0.27 a	0.22 b	0.17 c	0.07 d	0.06

الشكل (18): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على إنتاج الـ EPS بعد 24 ساعة من التحضين، يدل المخطط على أنَ إضافة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF إلى وسط نمو البكتيريا Xcm S101 قد خفض من تشكل السكريات المعقدة الخارجية مقارنة مع الشاهد، تشير الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.

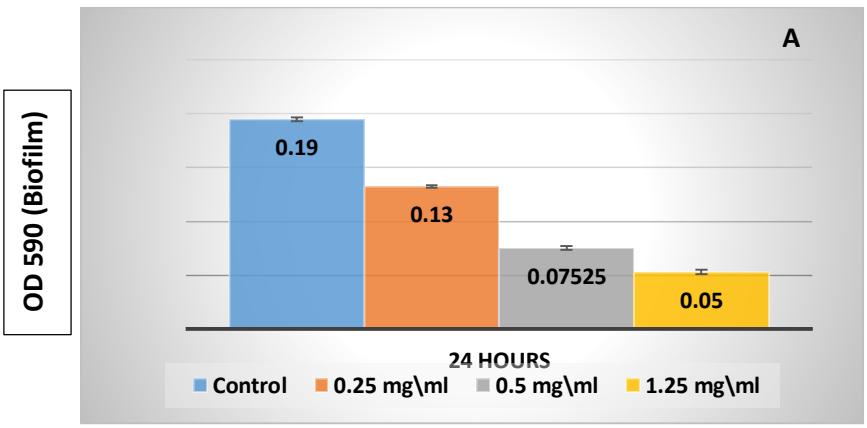
تطابقت النتائج مع Torres وآخرون (2007) الذي أشار إلى أن زيادة تركيز كل من الإشارات DSF، BDSF في في البكتيريا المطفرة بمورثة *RpfC*، نتج عنه انخفاض إنتاج الـ EPS. وأشار Wang وآخرون (2016) إلى أن حذف المورثة *Rpf* B أدى إلى إنتاج عالي من الإشارة الـ DSF و BDSF عند البكتيريا Xoo PX099A الأمر الذي أدى إلى خفض إنتاج الـ EPS، وكذلك أشار Zhou وآخرون (2015) إلى أن كلاً من الإشارتين DSF و IDSF تعمل كمثبطات إنتاج الـ EPS عند وصولها إلى تراكيز عالية في الوسط عند كل من Xcc و Xoo. وأشارت الدراسات المرجعية أن انخفاض كمية الـ EPS المنتجة تؤثر مباشرة على القدرة الإمراضية للبكتيريا وقدرتها على استعمار النسيج

النتائج والمناقشة

النباتي مما يؤدي إلى انخفاض نموها في الوسط الذي تعيش فيه (Vojnov وآخرون، 2009) مما يفتح المجال لإمكانية مكافحة هذه البكتيريا باستخدام إشارتها ضدها. ويعزى الإنتاج المنخفض للسكريات المعقدة الخارجية في البكتيريا المعاملة بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF إلى التأثير على نمو البكتيريا كما تبين ذلك في التجربة السابقة، حيث بالمقارنة وُجد إنتاج السكريات في المعاملات كانت منخفضة انخفاضاً يوافق انخفاض كثافة البكتيريا في الوسط، أيضاً وجود إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية مسبقاً أدى إلى تشـــويش العامل الممرض Pathogen Confusion كما ذكر ذلك (Caicedo وآخرون، 2017) الذي أشار إلى أنَ خلق تراكيز إضافية من الإشارة نفسها التي تتوسط الـ QS عند البكتيريا يجعلها تعبر عن عوامل القدرة الإمراضية بشكل مسبق قبل وصولها إلى الكثافة العددية المطلوبة لإحداث المرض مما ينتج عنه انخفاض القدرة الإمراضية للبكتيريا. كما أظهرت النتائج أنَ الإشارة النقية الـ DSF أو الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أثراً سلبياً في تشكّل Biofilm، حيث سبب وجودهما في الوسط الغذائي وجوداً مسبقاً في خفض تشكلها، ويظهر (الشكل 19) فروقا معنوية بين الشاهد ومعاملات الخلاصة البكتيرية عند مستوى معنوية $p<0.01$ بعد 24 ساعة من التحضين، فانخفضت كمية إنتاج الـ Biofilm تدريجياً في المعاملات mg\mL (0.25، 0.5، 1.25) كلما زاد تركيز خلاصة وسط زرع البكتيري Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF ما يقارب (31.6، 60، 74) % على التوالي مقارنة مع الشاهد، كما أظهرت النتائج (الشكل 20) فروقاً معنوية بين معاملات الإشارة النقية الـ DSF والشاهد عند مستوى معنوية $p<0.01$ بعد 24 ساعة من التحضين، متمثلةً بانخفاض إنتاج Biofilm في المعاملات µM (10، 50) من الإشارة النقية الـ DSF (≤ 90% Sigma) والتركيز mg\mL 0.5 من الخلاصة البكتيرية ما يقارب (57.5، 76، 63.8) % على التوالي مقارنة مع الشاهد، أظهرت النتائج تطابقاً مع النتائج السابقة ما يدل على أن إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية DSF تتحكم في قدرة البكتيريا على تشكيل البيوفيلم Biofilm تشكيلاً سلبياً. تطابقت هذه النتائج مع الدراسات المرجعية لأنواع بكتيرية أخرى فقد أشار Torres وآخرون (2007) أن إضافة خلاصة وسط الزرع للبكتيريا Xcc 8804 والمُطفرة في المورثة *Rpf* C والتي تعطي إنتاجاً عالياً من إشارات عائلة DSF إلى وسط النمو للبكتيريا

النتائج والمناقشة

Xcc البرية أدى إلى تثبيط تطور تشكل الـ Biofilm. كما أشار Siciliano وآخرون (2010) أن زيادة مستوى الـ DSF في وسط النمو البكتيري أدى إلى انخفاض مستوى تشكل الـ Biofilm تدريجياً، فإن التركيز العالي من عائلة الـ DSF يعمل على تشتيت تكوين الـ Biofilm عند Xcc الأمر الذي يعيق بقاء البكتيريا على قيد الحياة (Vojnov وآخرون، 2009)، وأشار Kumar وآخرون (2020) أن البكتيريا Xcc تعمل على تشتيت Biofilm الخاص بها من خلال التراكيز العالية من الإشارة الـ DSF التي تنظم تعبير المورثات اللازمة لهضم الـ EPS في الوسط الأمر الذي يؤدي إلى تشتت البيوفيلم بهدف انتقالها واستعمارها أنسجة جديدة وهذا ما وجدته نتائج التجربة السابقة التي أشارت إلى انخفاض إنتاج الـ EPS. كما أشار Marques وآخرون (2015) إلى أن إشارات الـ QS التي تستخدمها البكتيريا قادرة على منع تكوين الـ Biofilm وتشتيتها في الوسط ما يفسح المجال لإمكانية استخدامها في مجال مكافحة البكتيريا الممرضة، وأشار Dow وآخرون (2003) أن إشارات عائلة الـ DSF هي مضاد تجمع أي تعمل على تشتيت المجاميع البكتيرية الأم الذي يؤدي إلى تثبيط تشكل الـ Biofilm. ويعد انخفاض تشكل البيوفيلم في النتائج السابقة من أحد الأسباب التي أدت إلى خفض التعداد البكتيري في معاملات الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية DSF، أشار Vojnov وآخرون (2009) إلى أنَ وجود مستويات عالية من إشارات عائلة DSF في المرحلة المبكرة من نمو البكتيريا Xcc يمنع من تشكل الـ Biofilm الأمر الذي يعيق من بقاء البكتيريا على قيد الحياة.

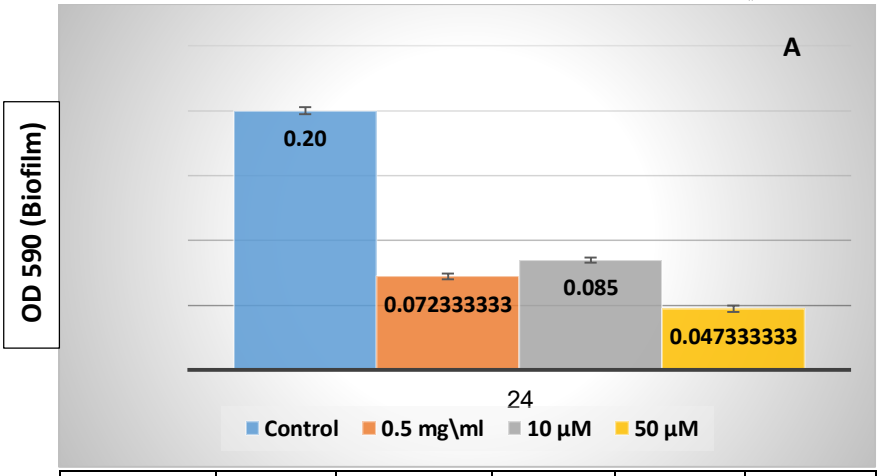


المعاملة /ساعة	Con	0.25 mg\mL	0.5 mg\mL	1.25 mg\mL	LSD 1%
24	0.19 a	0.13 b	0.075 c	0.05 d	0.021

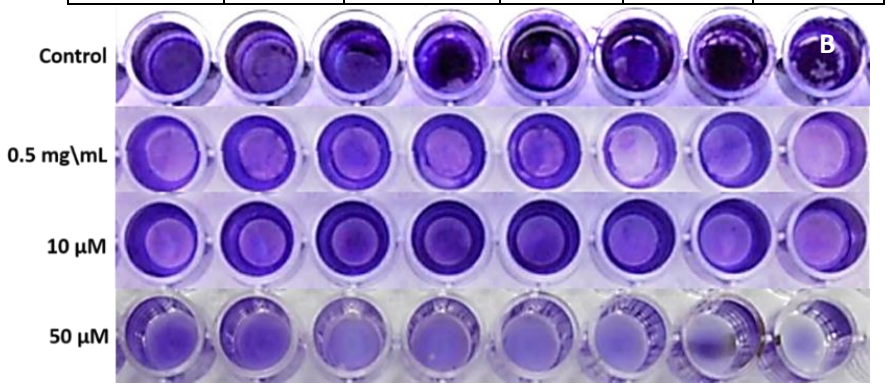
النتائج والمناقشة



الشكل (19): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تشكل الـ Biofilm؛ (A) التحديد الكمي لـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (B) صورة تمثيلية لـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، تشير الأحرف المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.



المعاملة /ساعة	Control	0.5 mg\mL	10 µM	50 µM	LSD 1%
24	0.2 a	0.073 b	0.085 c	0.047 d	0.028



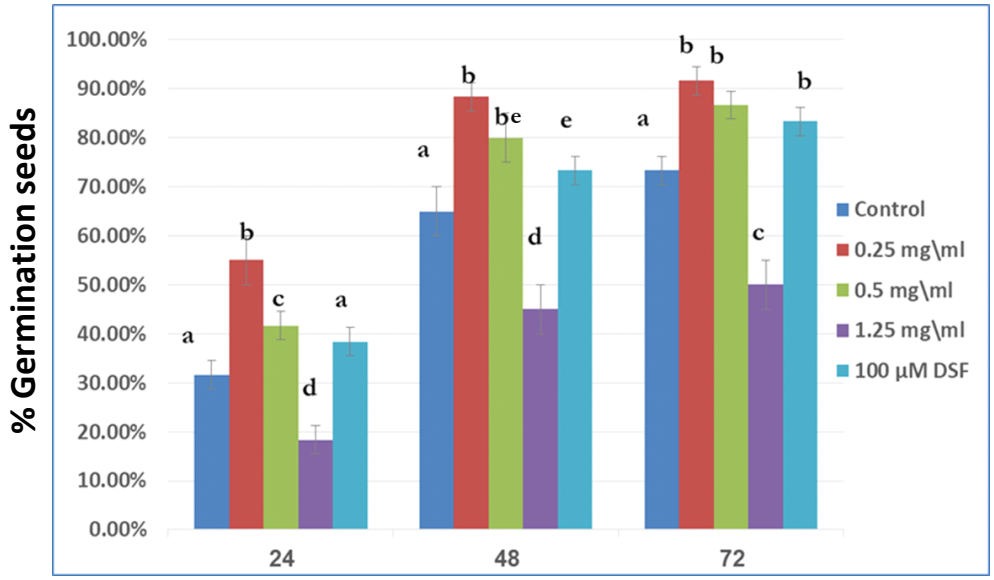
الشكل (20): تأثير الإشارة النقية الـ DSF مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد على تشكل الـ Biofilm ؛ (A): التحديد الكمي لـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بالإشارة النقية أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF متمثلة بمتوسط ثلاث مكررات لكل معاملة بالإضافة إلى الشاهد ± SD، (B): صورة تمثيلية لـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بالإشارة النقية أو الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، تشير الأحرف غير المتشابهة ضمن الصف الواحد إلى وجود فروق معنوية عند المستوى $p < 0.01$.

النتائج والمناقشة

3-3-التأثير في النبات العائل:

3-3-1-قدرة بذور القطن على الإنبات:

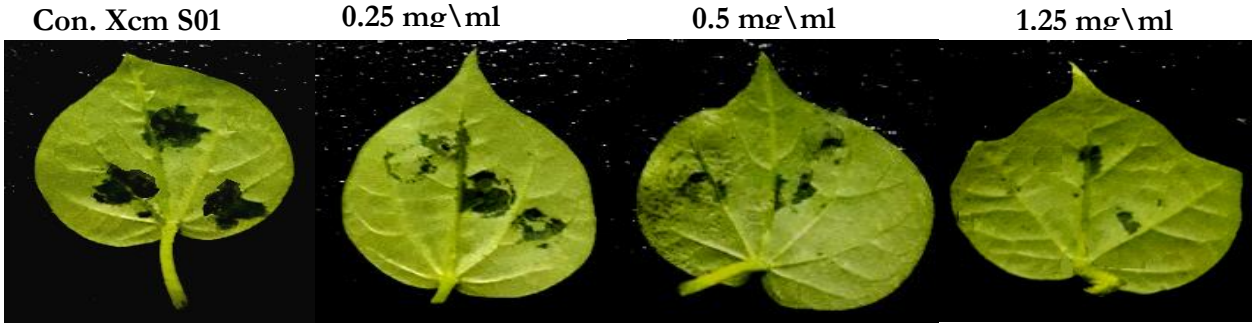
هدفت التجربة إلى دراسة تأثير كل من الإشارة النقية الـ DSF (≤ 90% Sigma) وخلاصة وسط الزرع البكتيري لـ Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على إنبات بذور القطن صنف حلب 33 كما هو موضح في مواد العمل وطرائقه. أظهرت النتائج قدرة كل من الإشارة النقية الـ DSF والخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تحسين إنبات البذور، فإن التركيزين mg\ml (0.25، 0.5) والخلاصة البكتيرية والتركيز 100 µM من الإشارة النقية الـ DSF ذات فعالية عالية في إنبات البذور طيلة مدة التحضين فكانت نسبة الإنبات بعد 72 ساعة (91.67%، 86.67%، 83.33%) على التوالي بينما بلغ عند الشاهد 73.33%، بينما التركيز العالي من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـDSF (1.25mg\mL) قد خفضت من نسبة إنبات للبذور فبلغت 50% بعد 72 ساعة من التحضين (الشكل 21). وأبدت التراكيز المنخفضة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والتركيز 100 µM من الإشارة النقية الـ DSF تأثيراً إيجابياً في تحسين الإنبات بينما التراكيز المرتفعة من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF كان لها تأثير سلبي.



الشكل (21): تأثير الإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط الزرع لـ Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة بذور القطن صنف حلب (33) على الإنبات متمثلة بمتوسط النسبة المئوية لإنبات البذور لثلاث مكررات لكل معاملة بالإضافة للشاهد ± SD، تشير الأحرف المتشابهة ضمن كل من 24، 48، 72 ساعة إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى 1%.

3-3-2-الحد من الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية لنباتات القطن:

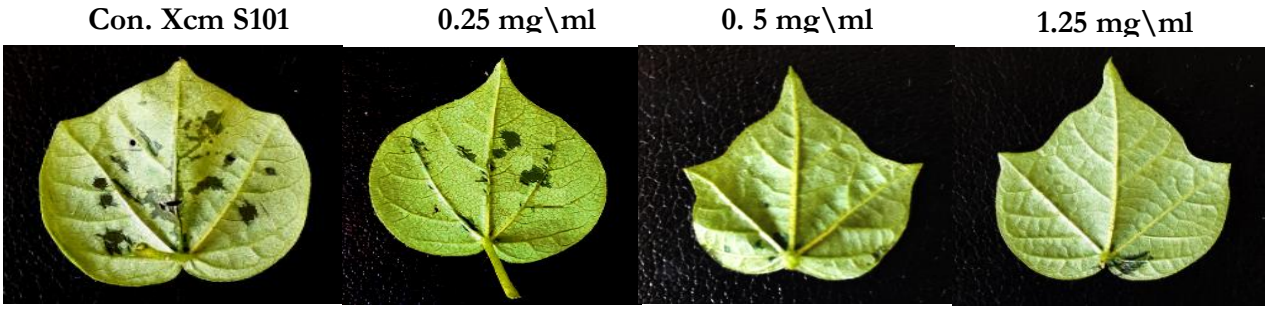
هدفت هذه التجربة إلى تحديد كفاءة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشـــــارات عائلة الـ DSF في الحد من تطور البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية، كما هو مذكور في مواد العمل وطرائقه، أظهرت النتائج الشكل (22) ظهور الأعراض المرضية بعد 4 أيام من العدوى بطريقة الحقن بسرنغ منزوعة الإبرة متمثلة بالبقع المائية Watersoaking، وقورنت الأعراض المرضية بين الشاهد والنباتات المُعاملة بذورها بالتراكيز المختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بعد 10 أيام من ظهور الأعراض المرضية، فقد لوحظ انخفاض الشدة المرضية في النباتات المُعاملة بذورها مع زيادة تركيز خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مقارنة مع الشاهد، الأمر الذي يشير إلى تحفيز المقاومة الجهازية في نبات القطن الأمر الذي حد من نمو المرض وتطوره مقارنة مع الشاهد.



الشكل (22): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الحد من شدة المرض في الأوراق الحقيقية المعاملة بذورها بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، حيث انخفضت الشدة المرضية كلما زاد تركيز الخلاصة (طريقة حقن الأوراق بالمعلق البكتيري).

أما بالنسبة للنباتات التي أُعديت بطريقة الرش فقد ظهرت البقع المائية على السطح السفلي للأوراق بعد 6 أيام من العدوى وكانت النتائج متشابهة لنتائج العدوى بطريقة الحقن، وقورنت الشدة المرضية بين النباتات المُعاملة بذورها بإشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm والشاهد بعد 10 أيام من ظهور الأعراض المرضية (الشكل 23). فقد انخفضت شدة المرض للنباتات المُعاملة بذورها مع زيادة تركيز خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm

S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مما يشير إلى تحفيز المقاومة الجهازية في نبات القطن الأمر الذي حد من نمو المرض وتطوره مقارنة مع الشاهد.



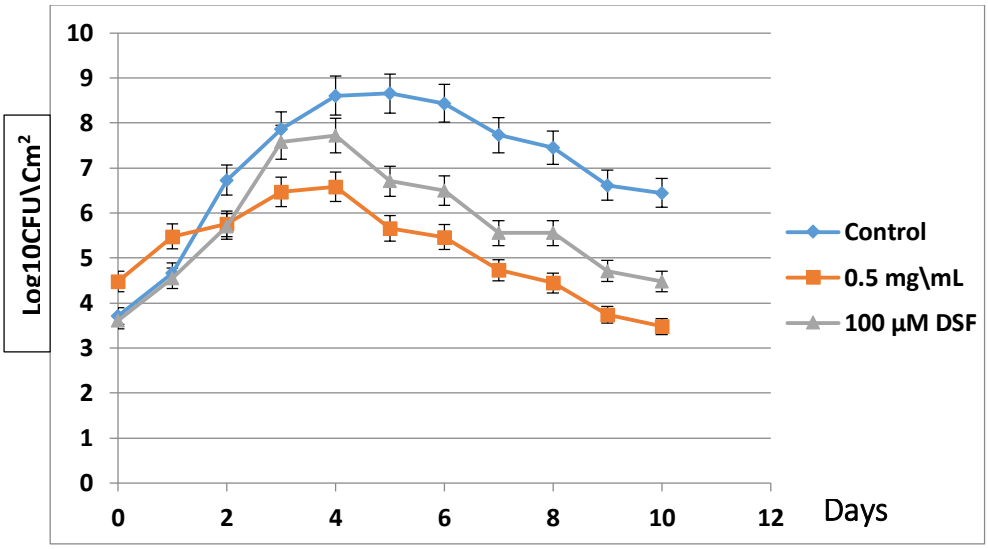
الشكل (23): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الحد من شدة المرض في الأوراق الحقيقية المعاملة بذورها بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، حيث انخفضت الشدة المرضية كلما زاد تركيز الخلاصة (طريقة رش الأوراق بالمعلق البكتيري).

وتُظهر النتائج انخفاضاً معنوياً في النسبة المئوية لشدة الإصابة في النباتات المعاملة مقارنة مع الشاهد، فأعطى التركيز 1.25 mg\mL أعلى فعالية في تخفيض شدة المرض وبفروق معنوية مع المعاملات الأخرى عند مستوى 5% حيث بلغت 71% مقارنة مع الشاهد، وتلاه التركيزان 0.5 mg\mL، 0.25 فبلغت انخفاض شدة الإصابة 55%، 24% على التوالي مقارنة مع الشاهد.

3-3-3-الحد من نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية لنباتات القطن.

هدفت هذه التجربة إلى تأثير كل من الإشارة النقية الـ DSF أوخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على نمو البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية. حيث أظهرت النتائج (الشكل A :24) أن النباتات التي نُقعت بذورها بالإشارة النقية DSF بتركيز 100 µM أو بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5 mg\mL قد انخفضت فيها النمو البكتيري بدءاً من الأيام الأولى من العدوى فوصلت نسبة الانخفاض في النمو البكتيري لوغاريتمياً إلى (0.9، 2.14) تقريباً على التوالي مقارنة مع الشاهد بعد 4 أيام من العدوى الاصطناعية واستمر النمو البكتيري بالانخفاض مقارنة مع الشاهد طيلة 10 أيام من العدوى الاصطناعية (الشكل B :25).

النتائج والمناقشة



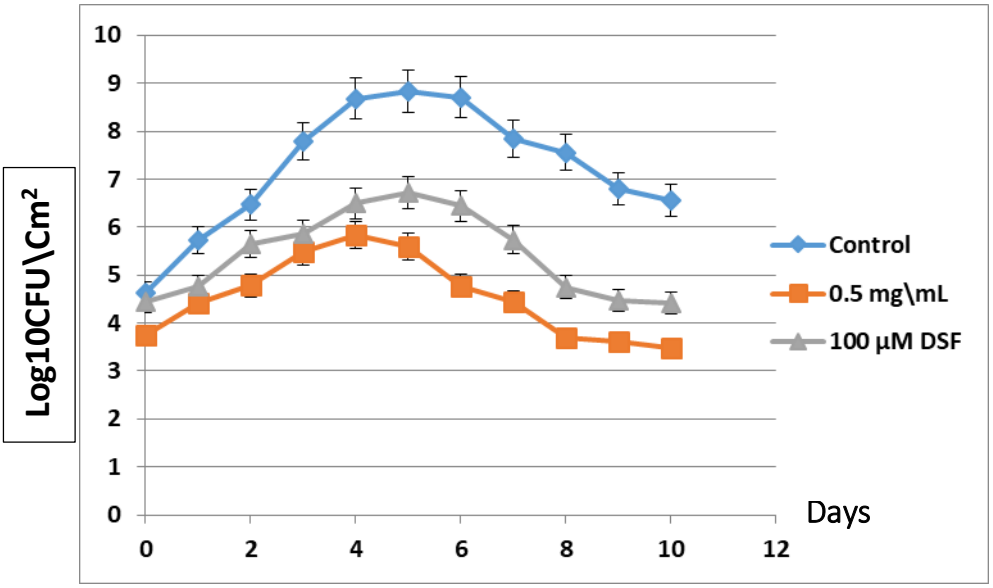


Control H2O | Control Xcm S101 | 0.5 mg\mL DSF | 100 µM DSF pure

الشكل (24): الكثافة البكتيرية لـXcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية المُعاملة مسبقاً بطريقة نقع البذور بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أوبالإشارة النقية DSF مقارنة مع الشاهد. حُسب التعداد البكتيري لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة بالإضافة إلى الشاهد ± SD.

وأظهرت النتائج (الشكل 25) أنّ الأوراق الفلقية للنباتات التي حُقنت مسبقاً بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100 µM أو بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 بتركيز 0.5 mg\mL قد انخفضت فيها النمو البكتيري بدءاً من الأيام الأولى من العدوى، فوصل نسبة الخفض في النمو لوغاريتمياً (2.19، 2.85) على التوالي مقارنة مع الشاهد بعد 4 أيام من العدوى الاصطناعية، واستمر النمو البكتيري بالانخفاض في المعاملات مقارنة مع الشاهد طيلة 10 أيام من العدوى.

النتائج والمناقشة



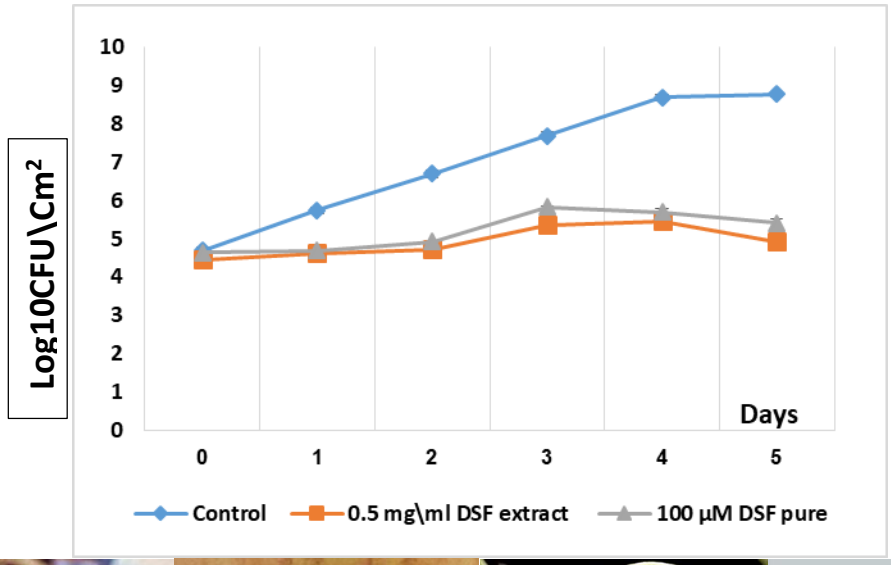


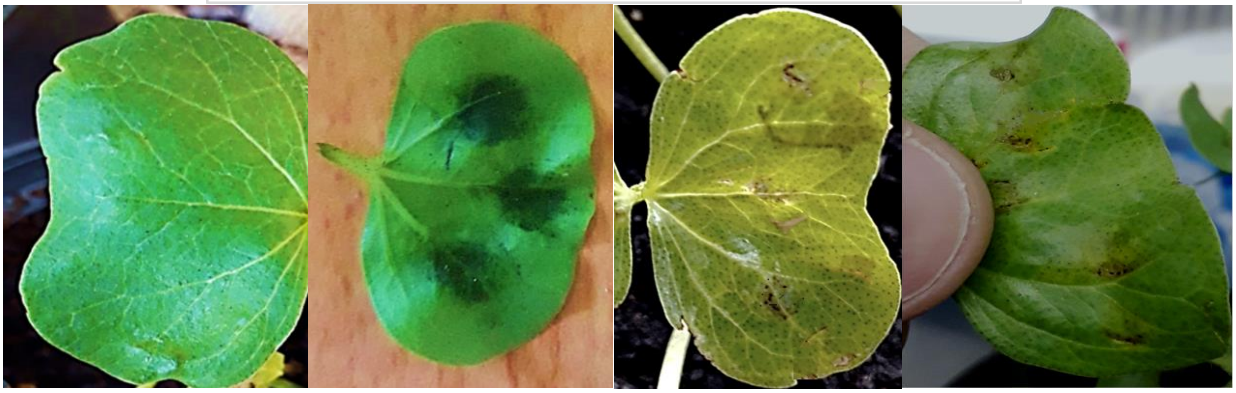
Control H2O | Control Xcm S101 | 0.5 mg\mL DSF extract | 100 µM DSF pure

الشكل (25): الكثافة البكتيرية لـ Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية بعد 24 ساعة من الحقن بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF مقارنة مع الشاهد. حُسب التعداد البكتيري لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة بالإضافة إلى الشاهد ± SD.

وتطابقت النتائج السابقة مع نتائج حقن الأوراق الفلقية بمعلق حاو على البكتيريا مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية DSF وأظهرت النتائج (الشكل 26) إلى انخفاض النمو البكتيري في الأوراق المُعاملة بالخلاصة أو الإشارة بدءاً من 24 ساعة بعد الحقن مقارنة مع الشاهد، فوصلت نسبة انخفاض النمو البكتيري في الأوراق المحقونة بالخلاصة أو الإشارة النقية لوغاريتمياً إلى (3.6، 2.54) على التوالي بعد 4 أيام من الحقن مقارنة مع الشاهد (الشكل 26).

النتائج والمناقشة





Control H2O | Control Xcm S101 | 0.5 mg\ml DSF extract | 100 µM DSF pure

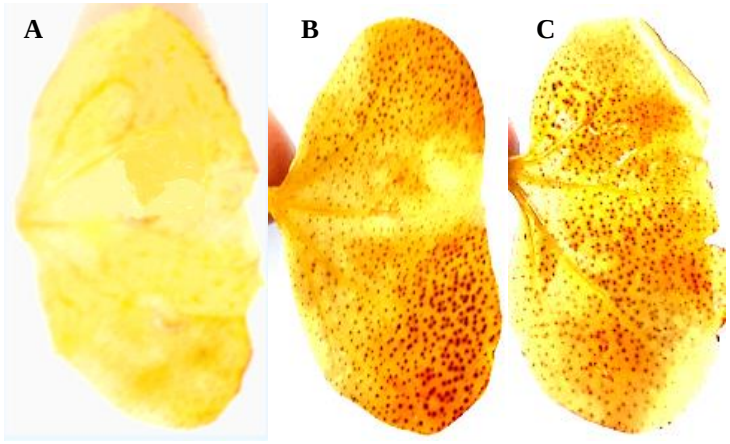
الشكل (26): الكثافة البكتيرية لـ Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية المعاملة مسبقاً بطريقة الحقن بمعلق حاوي على البكتيريا Xcm S101 مضافاً إليها خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية DSF مقارنة مع الشاهد. حُسب التعداد البكتيري لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة بالإضافة إلى الشاهد ± SD.

3-3-4-تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وتحفيز برنامج الموت الخلوي المبرمج:

هدف البحث إلى دراسة تأثير وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على تراكم بيروكسيد الهيدروجين وبرامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية لنبات القطن، أظهرت النتائج أن للإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF تأثيراً في تنشيط تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الذي ظهر على شكل ترسبات بنية اللون ضمن الأوراق الفلقية المعاملة مقارنة مع الشاهد، وأن الأوراق الفلقية المعاملة بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على

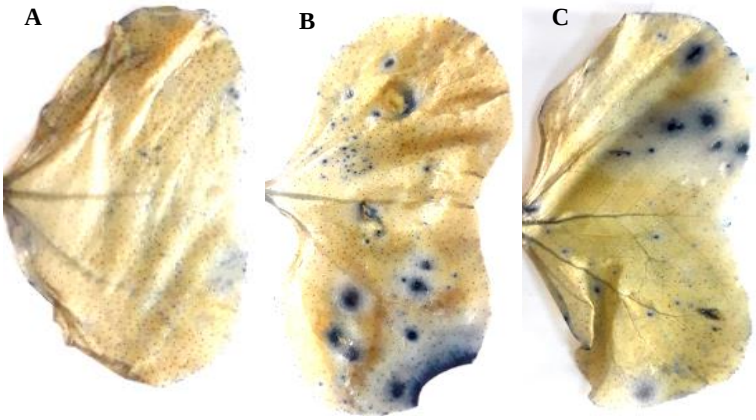
النتائج والمناقشة

إشارات عائلة الـ DSF أظهرت ترسباً بنياً أكثر من المعاملة بالإشارة النقية الـ DSF (الشكل 27)، أشارت الدراسات المرجعية إلى أن تراكم بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في الأنسجة النباتية تؤدي إلى تحفيز ردود الفعل الدفاعية في النبات فتعمل كإشارات موضعية محلية تسبب في حدوث فرط الحساسية، والمترافق لنظام الموت الخلوي المبرمج، كما تعمل كإشارات قابلة للانتشار لتحريض تعبير عدد من المورثات التي يشارك بعضها في الدفاع عن النبات (Hao وآخرون، 2011)، كذلك أشارت دراسات أخرى إلى أن تراكمه في الأنسجة النباتية يؤدي إلى التأثير على الممرض في أماكن غزوه، والمساهمة في بناء الجدار الخلوي وتقويته من خلال زيادة تركيز اللجنين والترابط التأكسدي للبروتينات الغنية بالهيدروكسي برولين، وبوليمرات جدار الخلية، والمساهمة في تركيب الفيتوألكسين، ويعمل كمركب إشارة في تحفيز المقاومة الجهازية في النبات، وإعاقة دخول الممرض والحد من انتشـــاره (Hathout وآخرون، 2010). كما أظهرت النتائج إلى تفعيل برنامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية المعاملة بمستخلص وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF من خلال تلون الخلايا الميتة بأزرق لاكتوفينول تريبان مقارنة مع الشاهد (الشكل 28).



الشكل (27) تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين في الأوراق الفلقية لنبات القطن بعمر 10 أيام، وتدل النقاط البنية على تراكمه في الأنسجة الورقية.

النتائج والمناقشة

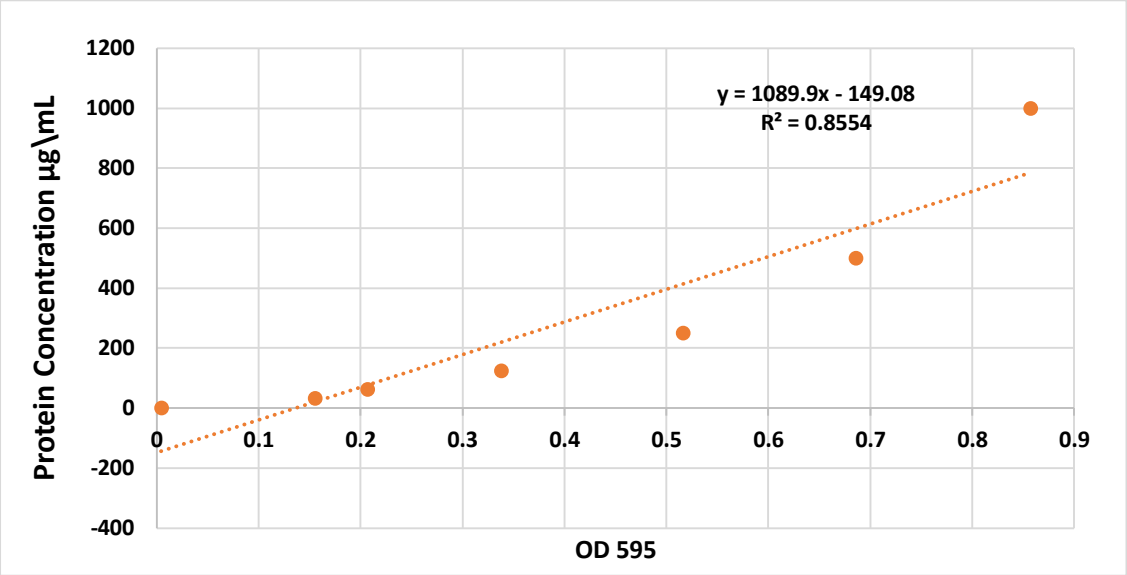


الشكل (28): تحفز برنامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية لبنات القطن المعاملة مسبقاً بطريقة الحقن بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF، حيث تدل النقاط باللون الأزرق على الخلايا النباتية الميتة.

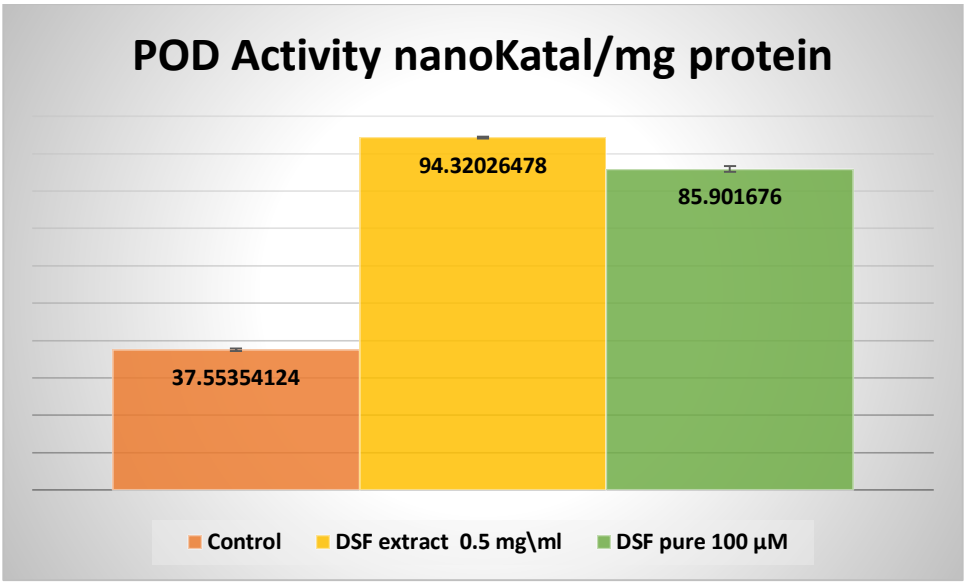
3-3-5- فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلقية:

قُيمت فعالية أنزيم البيروكسيداز من خلال القياس الطيفي بواسطة Spectrophotometer، في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية بعمر 10 أيام لنباتات القطن والمعاملة مروراً مع الزمن بطريقتين وهما: طريقة نقع البذور بكل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة DSF بتركيز 0.5 mg\mL أو الإشارة النقية DSF بتركيز 100µM لمدة 6 ساعات، والطريقة الثانية برش الأوراق الفلقية بعمر 10 أيام بكل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـDSF بتركيز 0.5 mg\mL والإشارة النقية DSF بتركيز 100 µM. وحُسبت معادلة الخط البياني (الشكل 29) لبروتين مصل البقر بطريقة برادفورد Bradford (1976) وبالتعويض في العينات المدروسة (المعاملات والشاهد) حُسبت تركيز البروتينات الكلية في المعاملات المدروسة فضلاً عن الشاهد، ثم قدرت الفعالية الأنزيمية الكلية لأنزيم البيروكسيداز بـ nanoKatal \mg لكل 1 mg بروتين من الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية المدروسة. فأظهرت النتائج (الشكل 30) زيادة نشاط فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية بعمر 10 أيام والمُعاملة بذورها بكل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF فبلغ nanKatal/mg (94.32، 85.9) على التوالي مقارنة مع الشـاهد الذي بلغ nanKatal/mg 37.55.

النتائج والمناقشة



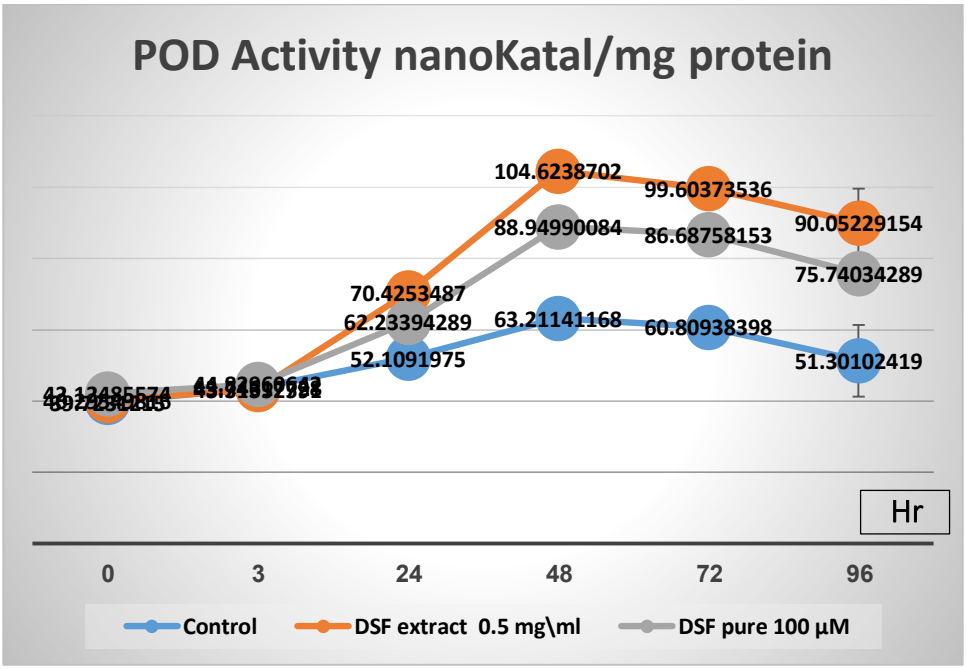
الشكل (29): معادلة الخط المستقيم لتركيز بروتين مصل البقر.



الشكل (30) زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD في الأوراق الفلقية لنباتات القطن بعمر 10 أيام المعاملة بطريقة نقع البذور.

وكذلك أظهرت النتائج (الشكل 31) زيادة في فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية التي رُشت بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة DSF والإشارة النقية DSF وكان أقصى تركيز للأنزيم بعد 48 ساعة من الرش فبلغ nanoKatal\mg (104.62 ، 88.95) على التوالي مقارنـــــة مع الـــــشاهد الذي بلغ 63.22 nanoKatal\mg.

النتائج والمناقشة



الشكل (31) زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD في الأوراق الفلقية لنباتات القطن المعاملة بطريقة الرش مروراً مع الزمن.

أظهرت النتائج أنَ لخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcms101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية أثراً إيجابياً في إنبات القطن فأدت معاملة البذور فيهما إلى زيادة نسبة إنبات البذور، وكذلك الحد من تطور البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية والأوراق الفلقية للنباتات المعاملة بذورها فيهما، مما يدل على تحفيزها للمقاومة الجهازية في نبات القطن وبينت ذلك بزيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلقية لنباتات عوملت بذورها فيهما. وكذلك أظهرت النتائج السابقة أن طريقتي الحقن بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية DSF قد حدَت من تطور نمو البكتيريا XcmS101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية بوضوح مقارنة مع الشاهد، فإنَ وجودهما في الأنسجة النباتية أثر سلبياً للبكتيريا XcmS101 بدءاً من تأثيرهما السلبي على عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا من نمو البكتيريا وبقائها وحركتها وإنتاجها للبروتياز والـ EPS وتشكلها البيوفيلم كما بين ذلك من خلال التجارب المخبرية، وتطابق ذلك مع بعض الدراسات المرجعية التي أشارت إلى أن وجود إشارات عائلة الـ DSF مسبقاً يمنع تشكل البيوفيلم العامل الأســـاســـي لبكتيريا الجنس *Xanthomonas* لإحداث المرض وانخفاض إنتاج الـ EPS مما يجعل البكتيريا معرضة للعوامل غير المرغوب بها حولها مما يؤدي إلى موتها (Torres وآخرون، 2007)، وكذلك

النتائج والمناقشة

تطابقت مع Lonsecu وآخرين (2016) والذي أشار إلى وجود إشارات عائلة الـ DSF مسبقاً في نبات العنب يؤدي إلى تثبيط حركة البكتيريا *Xylella fastidiosa* وموتها. كذلك الأمر تأثير كل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF على ردود الفعل الدفاعية فأظهرت النتائج أن الأوراق الفلقية لنباتات القطن التي حُقنت أوراقها فيهما قد تراكمت فيها بيروكسيد الهيدروجين وحفَزت نظام الموت الخلوي المبرمج مما يدل على قدرتهما على تحريض المقاومة الموضعية المستحثة في النبات، وكذلك أظهرت النتائج أثرهما في زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلقية التي رُشت بهما مقارنة مع الشاهد وهذا مؤشر على تحفيز المقاومة الموضعية المستحثة في نبات القطن، وتطابقت هذه النتائج مع الدراسات المرجعية التي أشـــارت إلى الإشارة الـ DSF بحد ذاتها قد تؤثر في تنشيط ردود الفعل الدفاعية في النبات المعامل بها التي تؤدي في النهاية إلى إضعاف كل من النمو البكتيري والتعبير الجيني لعوامل القدرة الإمراضية (Kakkar وآخرون 2015)، فأشار إلى الإشـــــارة الـ DSF تعمل على تحفيز ردود الفعل الدفاعية في النبات متمثلة برد فعل مشابه لفرط الحساسية، وتراكم البروتينات المرتبطة بالعامل الممرض PR1، والمركبات الوميضية الدفاعية، وتراكم بيروكسيد الهيدروجين، وتحفيز نظام الموت الخلوي المبرمج، كما أن معاملة نبات الزر بالإشارة الـ DSF أدى إلى انخفاض مرض اللفحة البكتيرية على الرز Xoo، وذلك عند استخدام تراكيز أعلى من 20 µM من الإشارة DSF، بينما أشار Dow وآخرون (2016) إلى أنّ معاملة النبات بالإشارة الـ DSF بتراكيز منخفضة أقل من 20 µM تحفز الدفاعات الأولية عند البنات المعامل بها بطريقة مشابه لعمل السياط البكتيرية Flagellin peptides (المحفز الميكروبي PAMP). كما أشارت الدراسات المرجعية إلى أن وجود إشارات عائلة الـ DSF مسبقاً في وسط نمو البكتيريا تجعل البكتيريا تعبر عن عوامل قدرتها الإمراضية مبكراً قبل وصول كثافتها العددية إلى المستوى المطلوب لاستحثاث الـ QS لإنتاج تلك العوامل، مما يساعد ذلك على تحفيز ردود الفعل الدفاعية في النبات ضد الأعداد القليلة من البكتيريا والإنتاج المنخفض من عوامل القدرة الإمراضية وهذا ما يعرف بتشويش العامل الممرض Pathogen Confusion (Dow، 2016). وأشارت الدراسات المرجعية أنّ عائلة الإشارة DSF من مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة من النمط Cis التي لها رابطة مزدوجة عند الموضع 2،

النتائج والمناقشة

وقد ثبت أنها ميزة هيكلية رئيسية كجزيء QS فيتم التعّرف عليها من قبل النباتات بمسارات مشابهة لمسارات التعَرف على الحموض الدهنية غير المشبعة، ويقوم DSF بتحفيز ردود الفعل الدفاعية الطبيعية في النبات (Bostock وآخرون، 2005)، وأنَ مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة الخارجية والداخلية تعد جيلاً جديداً من محرضات المقاومة والتي تؤثر في ردود الفعل الدفاعية في النبات والتأثير على التفاعلات بين النبات والميكروبات (Upchurch، 2008؛ Kachroo وآخرون، 2001، 2003؛ Savchenko وآخرون، 2010)، وإن الأحماض الدهنية الخارجية غير متوفرة بكثرة في النباتات، مثل Eicosapentaenoic acid، و Arachidonic acid، والتي تعد بمثابة محفزات قوية لإحداث الاستجابة الدفاعية في النباتات الباذنجانية (Bostock وآخرون، 1981؛ Knight وآخرون، 2001)، وأشارت الدراسات (Amruthesh وآخرون، 2005) إلى أن ستة أحماض دهنية غير مشبعة وهي: Docosah-exaenoic (DHA)، Eicosa pentaenoic (EPA)، Arachidonic acid (AA)، linolenic acid و Linoleic acid، و Oleic acid، وجميعها وجدت في الأصل في أبواغ الفطر *Sclerospora graminicola*، قد أظهرت قدرتها على تحريض المقاومة في نبات اللفت الزيتي عند معاملة بذور الأصناف الحساسة بهذه الأحماض، كما أظهرت النتائج زيادة نسبة الإنبات للبذور المعاملة كما زادت من صفاتها الانتاجية كماً ونوعاً.

النتائج والمناقشة

الاستنتاجات Conclusions

1- دور إشارات عائلة الـ DSF في التحكم السلبي في قدرة البكتيريا على التعبير عن عوامل القدرة الإمراضية مخبرياً، فانخفضت قدرة البكتيريا المعاملة مسبقاً بها على النمو والبقاء، والحركة، وإنتاج البروتياز، وإنتاج السكريات المعقدة الخارجية، وتشكل Biofilm.

2- تحسن إنبات بذور القطن صنف حلب 33 المعاملة مُسبقاً بإشارات عائلة الـ DSF بتراكيز mg\mL (0.25، 0.5) من الخلاصة البكتبرية، وتركيز µM 100 من الإشارة النقية الـ DSF، وانخفاض إنباتها عند المعاملة بالتراكيز العالية mg\mL 1.25 من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF.

3- انخفاض الشدة المرضية للبكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية لنبات القطن المعاملة بذورها بالنقع بإشارات عائلة الـ DSF قبل الزراعة، وأعطى التركيز mg\mL 1.25 أكثر فعالية في خفض شدة المرض.

4- انخفاض نمو البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية لنباتات القطن المعاملة بطريقة النقع أو الحقن بإشارات عائلة الـ DSF.

5- تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وتحفيز نظام الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية المعاملة بطريقة الحقن بإشارات عائلة الـ DSF.

6- تحفز المقاومة الجهازية المكتسبة والمقاومة الموضعية المكتسبة في الأوراق الفلقية لنباتات القطن المعاملة بطريقة نقع البذور أو الرش بإشارات عائلة الـ DSF كما تبين ذلك من خلال ارتفاع مستويات أنزيم البيروكسيداز في الأوراق النباتية المعاملة مسبقاً.

التوصيات Recommends

1- العمل على تنقية إشارات عائلة الـ DSF للبكتيريا Xcm S101 من الأنسجة النباتية لنبات القطن، ومعرفة أكثرها تركيزاً ضمن الأنسجة النباتية.

2- دراسة تأثير إشارات عائلة الـ DSF على الصفات الإنتاجية والشكلية لمحصول القطن.

3- دراسة تأثير إشارات عائلة الـ DSF على بقية الآفات الحشرية والمسببات المرضية التي تصيب محصول القطن.

4- العمل على إنتاج أصناف من نبات القطن معدلة وراثيا بإضافة المورثة F *Rpf* المسؤولة عن إنتاج إشارات عائلة الـ DSF لجعل النبات ينتج هذه الإشارات مما يجعل الممرض في حالة تشوش وبالتال انخفاض قدرته الإمراضية.

5- استخدام مشتقات حموض دهنية غير مشبعة مشابه لإشارات عائلة الـ DSF في عملية التشويش على الكائن الممرض Pathogen Confusion.

قائمة المراجع Bibliography

1- يونس، علي؛ جلول، عايدة؛ أبوغرة، محمود. (2018). الكشف عن إشارات التواصل البكتيري من عائلة الـ DSF عند بكتيريا التبقع الزاوي على القطن *Xanthomonas citri* subsp.*malvacearum*. رسالة ماجستير، كلية الزراعة-جامعة دمشق، ص 1-62.

2- وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. (2020). المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية.

3- Alavi, P., Muller, H., Cardinale, M., Zachow, C., Sa´nchez, B., Martinez, J., Berg, G. (2013). The DSF Quorum Sensing System Controls the Positive Influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on Plants. PLOS ONE. Volume 8 | Issue 7 | DOI.10.1371/ journal.pone.0067103.

4- Allen, S.J., and L.D, West. (1991). Predominance of race 18 of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* on cotton in Australia. Plant Dis. 75:43-44.

5- Alagarasan, G., Aswathy, K.S., and Madhaiyan, M. (2017). Shoot the message, not the messenger-combating pathogenic virulence in plant by inhibiting Quorum Sensing Mediated Signaling Molecules. Frontiers in plant science.VOL.8 556.

6- Amruthesh, K.N., Geetha, N.P., Jørgensen, H.J. L., de Neergaard, E., and Shetty, H. S. (2005). Unsaturated fatty acids from zoospores of *Sclerospora graminicola* induce resistance in pearl millet. European Journal of Plant Pathology .111: 125-137.doi.org /10.1007/s10658-004-1590-9.

7- An, S.Q., and Tang, J.L. (2018). Diffusible signal factor signaling regulates multiple functions in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Res Notes (2018) 11:569.

8- Attoma, D., Sponari, M., Morelli, M., Giampetuzzi, A., Savino, V.N., Bisica, D., and Saldarelli, P. (2016). Exploiting pathogen confusion strategy to achieve *Xylella fastidiosa* biocontrol. Convegno Nazionle SIPaV. XXII (84-86).

9- Atiq, M., Arooj, S., Rajput, N., Ahmed, R., Bashir, M.R., Javed, N., Haq, E., Abbas.,W., and Babar, K.(2017). Induction of systemic resistance in cotton against bacterial blight and its effect on yield. int. j. biol. biotech, 14 (4): 591-595.

10- Baltenneck, J., Reverchon, S., Hommais, F. (2021). Quorum Sensing Regulation in Phytop athogenic Bacteria. PubMED. Microorganisms. 24;9(2):239. doi: 10.3390/ microorganismms90 20239.

11- Barber,C.E., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wilson,T.J., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P., and Daniels, M.J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity

of *Xanthomonas campestris* is mediumsted by a small diffusible signal molecule. Molecular. Microbiology 243, 555-66. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.3721 736.x.

12- Bainton, N.J., Bycroft, B.W., Chabra, S.R., Stead, P., Gledhill, L., Hill, P.J., et al. (1992) A general role for the lux autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in Erwinia. Gene 116: 87- 91.

13- Bautista, N.F., Núñez, J.A. D., Moreno, M. M., and Lobo, M.B. (2016). Plant Tissue Trypan Bl-ue Staining during Phytopathogen Infection DOI:10.21769/BioProtoc.2078.

14- Bi, H., Dong, H., and Cronan, J.E. (2014). *Xanthomonas campestris* RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase. Mol. Microbiol. pp.262-75. Doi:10.1111/mmi.12657.

15- Bostock, R.M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. Annual Review of Phytopathology 43,545-580.DOI.10.1146/ annurev. phyto. 41. 052002. 095505.

16- Bostock, R.M., Kuc, J.A., Laine, Ra.(1981). Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid from Phytophthora infestans elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. Science 212,67-69. DOI.10.1126/science.212.4490.67.

17- Bostock, R.M., Yamamoto, H. D,Choi., Ricker, K.E.,Ward, B.L. (1992). Rapid stimulation of 5-lipoxygynase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic. Plant physiology 100. 1448-1456. DOI.10.1104/pp.100.3.1448.

18- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.***72**, 248-254. doi.org/10.1016/003-2697 (76) 905273.

19- Bayles,M.B., and Verhalen, L.M.(2007). Bacterial blight reactions of sixty one Upland cotton cultivars. The Journal of Cotton Science 11,40-51.

20- Cai, Z., Yuan,Z.H., Zhang, H., Pan,Y., Wu, Y., and Tian, X.Q. (2017). Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum- sensing and virulence. PLoS Pathog 13(4): pp.223-34. e1006304. doi.org/10.1371/journal. ppat.1006304.

21- Caicedo, J. C. Villamizar, S., and Ferro, J. A. (2017). Quorum Sensing, It's Role in Virulence and Symptomatology in Bacterial Citrus Canker. Doi /10.5772/66721.

قائمة المراجع

22- Calvo, A.M., Hinze, L.L., Gardner, H.W., Keller, N.P.(1999). Sporogenic effect of polyuns aturated fatty acids on development of Aspergillus spp. Appl Environ Microbiol, 65, pp. 3668-3673.

23- Chan, X., Schauder, S., Potier, N., Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., and Hughson, FM. (1998) Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. Nature 415: 545 – 549.

24- Chatterjee, A., Aparna, G., and Santi, R.V.(2008). A cell wall-degrading esterase of *Xanthomonas oryzae* requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. Plant Cell21: 1860-1873.DOI. 10.1105/tpc.109.066886.

25- Chester, K.S. (1933). The Problem of Acquired Physiological Immunity in Plants. The Quarterly Review of Biology Vol. 8, No. 3 (Sep., 1933), pp. 275-324 (50 pages).

26- Chouhary, D., Prakash, A., Johri, B.N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. Indian J Microbial. Doi:10.1007/s12088-007-0054-2.

27- Dalio, R., Magalhães, D.M., Rodrigues, C.M., Arena, G.D. , Oliveira, T.S., Souza-Neto, R.R., Picchi, S.C. , Martins, Paula., Santos, P ., Maximo, H.J., Pacheco, I.S., De Souza, A.A., and Machado, M.A.(2017). PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus–pathogen interactions. Ann Bot.; 119(5): 749–774. Published online 2017 Jan 8. doi: 10.1093/aob/mcw238.

28- Daudi, A., and O'Brien, J.A. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. Bio Protoc. 2012; 2(18). PMC4932902.

29- Darrasse, A., Carrère, S., Barbe, V., Boureau, T., and Arrieta, M.(2014). Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. BMC Genomics. doi: 10.1186/1471-2164-14-761.

30- Delannoy, E., Lyon, B.R., Jalloul, A., Marmey, P., Daniel, J.F., Montillet, J.L., Essenberg, M., and Nicole, M.(2005). Resistance of Cotton Towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Annual Review of Phytopathology,doi/10.1146/annurev.phyto .43 .040204. 140251.

31- Deng, Y., Lim, A., Lee, J., Chen, S., and An, S. (2014). Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules enhance the antimicrobial efficacy of

antibiotics against some bacterial pathogens. BMC Microbiol 14:51. https://doi.org/10.1186 /14 71 -2180-14-51.

32- Deng, Y., Wu, J., Tao, F., and Zhang, L.H. (2011). Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. Chem. Rev.111,160–173.DOI.org /10. 1021/ cr100354f.

33- Deng, Y., Wu, J., Yin, W., Li, P., Zhou, J., Chen, S., He, F., Cai, J., and Zhang, L. (2016). Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition Env iron Microbiol 18 (5) :1534-45. doi: 10.1111/1 462-2920.13244.

34- Doughari, J.H. (2015). An Overview of Plant Immunity. Plant Pathology and Microbiology. ISSN: 2157-7471 JPPM, Volume 6 • Issue 11. DOI.10.4172/2157-7471.100 0322.

35- Choudhary, D. K., Prakash, A., and Johri, B. N,(2007) Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action Indian J. Microbiol. .47:289–297.

36- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X., and Tang, J. L. (2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. DOI: 10.1073/ pnas.1833360100.

37- Dow, J.M. (2016). Diffusible Signal Factor (DSF)-dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. J Appl Microbiol. DOI: 10.1111/jam.13307.

38- Dye, D.W., Bradbury, J.F., Goto, M., Hayward, A.C., Lelliott, R.A., and Schroth, M.N. (1980). Internatio nal standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Review of Plant Pathology, 59(4):153-168.

39- Eckardt, N.A. (2017). The Plant Cell Reviews Plant Immunity: Receptor-Like Kinases, ROS-RLK Crosstalk, Quantitative Resistance, and the Growth/Defense Trade-Off The Plant Cell, Vol. 29: 60 1–602.

Fan, X., Ye, T., Li, Q., Bhatt, P., Zhang, L., and Chen, S. (2020). Potential of a Quorum Quenching Bacteria Isolate *Ochrobactrum intermedium* D-2 against Soft Rot pathogen *Pectob acterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Front. Microbiol.,| https://doi.org/10.3389/ fmicb. 2020.00898.

40- Felix, G., and Boller, T. (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. Journal of Biological Chemistry 278, 6201–6208. DOI.1-.1074/jbc .M2098 80200.

قائمة المراجع

41- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. The Plant Journal 18, 265–276. DOI.10.1046/j.1365-313x.100-.00265.x.

42- Fouhy, Y., Scanlon, K., Schouest, K., Spillane, C., Crossman, L., and Avison, M.B. (2007). Diffusible Signal Factor- Dependent Cell-Cell Signaling and Virulence in the Nosocomial Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. J Bacteriol 189:4964-8. doi: 10.1128/JB.00310-07.

43- Frederick, V., Craemer, S.De., Debunn, N.,Janssens, Y., Wynendaele, E., and Spiegeler, B.(2017). Peptides as Quorum Sensing Molecules:Measurement Techniq ues and Obtai ned Levels In vitro and In vivo.Frontiers in Neuroscience .doi .10.3389\fnins.2017 . 00183.

44- Gabriel, D. W., Kingsley., Kingsley, M.T., Hunter, J.E., and Gottwald, T. (1989). Re-instatement of *Xanthomonas campestris* differing in aggressiveness on Swingle citrumelo and grapefruit. Phytopathology 81:666-671.

45- Gan, C., Yin, W.F., and Wong, C.S.(2011). Coexistence of Quorum Qeunching and quorum sensing in tropical marine Pseudomomas aeruginosa strain MW3A. WORLDj MicrobiolBitechnol.28: 453-461.

46- Guo, Y., Zhang, Y., Li, J.L., Wang, N. (2012). Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Mol Plant Microbe Interact; 25(2) :165-79. DOI:10. 1094/mpmi-07-11-0184.

47- Hartman, G.L., Pawlowski, M.L., Chang, H.X., and Hill, C.B. (2016). Successful Technologies and Approaches Used to Develop and Manage Resistance against Crop Diseases and Pests. Emerging Technologies for Promoting Food Security. doi.org /10.1016/ B978-1-78242-335-5.0003.

48- Hathout, T.A., Felaifel, M.S., EL-Khallal, S.M., Abo-Ghalia, H.H., and Rabab, A.G. (2010). Biocontrol of Phaseolus Vulgaris Root Rot Using *Arbuscular Mycorrhizae*.J. Agric. Res. 88: 15-25. DOI.10.21608/ EJAR.2010.18-193.

49- Hao, X., Yu, K., Ma, Song, Q., Li, H., Wang, M. (2011). Histochemical studies on the accumulation of H_2O_2 and hypersensitive cell death in the nohost resistance of pepper against *Blumeria graminis* f. sp. *tritic*. Physiological and Molecular Plant Pathology. Volume 76, Issue 2, Pages 104-111. doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.07.003.

50- Hayward, A.C. (1964). Bacteriophage Sensitivity and Biochemical Group in *Xanthomonas malvacearum*. Microbiology 35: 287-298. doi: 10.1099/00221287-35-2-287.

قائمة المراجع

51- He, Y.W., Wu, J., Zhou, L., Yang, F., He, Y.Q., Jiang, B.L., Bai, L., Xu, Y., Deng, Z., Tang, J.L., and Zhang, L.H. (2011). *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and associated with Xanthomonadin biosyn-thesis, cell viability, antioxidant activity and systemic invasion. DOI: 10.1094/MPMI-02-11-0031.

52- He, Y.W., Wu, W., Cha, J., and Zhang, L.H. (2010). Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. BMC Microbiol. 10.187. Doi.147-218/10/187.

53- He, Y.W., Xu, M., YJ, N., Wang, L.H., Zhang, H.B., and Dow, J.M.(2006). Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*: identification of novel cell-cell communication- dependent genes and functions. MOL. Microbiol.: 610-22.DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04961.x.

54- He, Y.W., Zhou, L., Wang, X.Y., and Jiang, B.L.(2015). Identification and characterization of naturally occurring DSF-family Quorum Sensing signal turnover system in the phytopathogen *Xanthomonas*. Environ Microbiol 17:4646-4658.DOI: 10.1111/1462-2920.129 99.

55- Hernandez, C., Schenk, S.T., Neuman, C., Kogel, K.H., and Schikoria, A. (2014). N-acyl-homosrine lactones- producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. Microb Biotechol. Doi: 10.1111/1751-7915.12177.

56- Jakobsen, T.H., Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Givskov, M., Hoiby, N.(2013). Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors. PubMed Future Microbiol.8 921-10.2217/fmb.1357.

57- Jalloul,A., Sayegh, M., Champion ., Nicole, M.(2015). Bacterial blight of cotton. in Phytopathology Mediterranean 54(1):3-20.P.233-243.

58- Jalloul, A., Montillet, J.L., Assigbetse, K., and Angel, J.P. (2002). Liid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role lipoxygenases during the hypersensitive reaction. The Plant Journal 32(1);1-12.

59- Jayraman, A., and Wood, T.K. (2008). Bacterial quorum sensing : Signals, circuits, and implications for biofilms and diseases. ANNU. REV. Biofouling., 10, 145-167.

60- Kachroo, P., Kachroo, A., Lapchyk, L., Hildebrand, D., Klessig, D.F.(2003). Restoration of de-fective cross talk in *ssi2* mutants: role of Salicylic acid. jasmonic acid, and fatty acids in SSI2-med-iated signaling. Molecular Plant Microbe Interactions 16, 1022-1029.DOI.10.1094. /MPMI.2003.16.11.1022.

61- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J., Klessig, D.F. (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98, 9448–9453.DOI.org/10.1073/pnas.151258398.

62- Kakkar, A., Nizampatnam, N.R., A. Reddy, K., Pradhan, B. B., and Chatterjee, S. (2015). *Xanthomonas campestris* cell–cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. Journal of Experimental Botany. 212–219.Doi.10.1093/jxb/ erv377.

63- Knight V.I., H, Wang., J.–E, Lincoln., E.C, Lulai., D.G, Gilchrist., R.M, Bostock. (2001). Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59, 277–286

64- Kunze, G., Robatzek, Z.C., Niehaus, S., Boller, K., and Felix, T. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. The Plant Cell 16, 3496–3507. doi.org/10.115 /tpc.104.026765.

65- Li, L., Li, J., Zhang, Y., and Wang, N. (2019). Diffusible signal factor (DSF)–mediated quorum sensing modulates expression of diverse traits in *Xanthomonas citri* and responses of citrus plants to promote disease. BMC Genomics 20, 55. https://doi.org/10.1186/s12864-018-5384-4

66- Liu, F., Zhao, Q., Jia, Z., Song, C., Huang, Y., Ma, H., and Song, S. (2020). N–3–oxo–oc–tanoyl–homoserine lactone mediated priming of resistance to *Pseudomonas syringae* required the salicylic acid signaling pathway in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology.doi.prg/10.1186 /s12870-019-228-6.

67- Lonescu, M., Baccari, C., Da, Silva., A. Garcia., K,Yokota., and S.E, Lindow. (2013). Diffusible Signal Factor (DSF) Synthase RpfF of Xylella fastidiosa is a Multif unction Protein Also Required for Response to DSF. J Bacteriol 195,52 73–84. DOI.10.1128/JB.00713-13.

68- Lonescu, M., Yokota, K., Antonova, E., Garcia, A., Beaulieu, E., Hayes, T., and Lindow, S.E.(2016). Promiscuous Diffusible Signal Factor Production and Responsiveness of the Xylella fastidiosa Rpf System. AMericam Society for Microbiology. VOL.7, Issue 4, 054–16.

69- Marmey, P., Jalloul, A., A, Alhamdia., M., Assigbetse., K, Cacas., J, Voloudakis., A, Champoion., A, Clerivet., A, Montillet., M, Nicole. (2007). The 9–lipoxygynase GHLOXI gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton Gossypium hirsutum to Xanthomonas campestris pv. malvacearum. Plant physiology and biochemistry. 45, 596–606.

70- Marques, C. N. H., Davies, D.G., and Sauer, K. (2015). Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid. Pharmaceuticals 2015, 8, 816-835; doi: 10.3390/ph8040816.

71- Martinez, C., Baccou , J., Bresson. E., Baissac, Y., Daniel, J., 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.* American Society of Plant Physiologists. 122, 757-766.DOI.10.114/pp.122.3.757.

72- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., Bauer, W.D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. Proc Natl AcadSci USA 100:1444-1449. Doi:10.1073/pnas .262672599.

73- Margaret, E., Teasdale, J., Joselynn, W., Fatemeh, A., and Rowley, C.(1992). Secondary Met abolites Produced by the Marine Bacterium Halobacillus salinus That Inhibit Quorum Sensing Controlled Phenotypes in Gram-Negative Bacteria. American society of microbiology.DOI: 10.1128/AEM.00632-08.

74- Moshynets, O.V., Babenko, L., Rogalsky, S., Lungin, O.S., Foster, J., Kosakivska, I., Potters, G., Spiers, A. J. (2019). Priming winter wheat seeds with the bacterial quorum-sensing signal N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) shows potential to improve plant growth and seed yield. PLoS ONE 14(2): e0209460. http://doi.org/10.1371/ journal. Pone 0209460.

75- Metha, Y.R., Ceida, B., Viviani, B., (2005). A semi selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infected cotton seed. Fitopatol. Bras , vol. 30, n-5, pp-489-496. ISSN 0100-4158. Doi.10.1590/S0100-42520050 00500005.

76- Nafie, E., Hathout, T., and Al Mokadem, Al. S. (2011). Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumismelo* L. cells. Braz. J. Plant Physiol., 23(2): 161-174. DOI.org /10.1590/ S1677-04202011000200008.

77- Naman, R., Jalloul, A., Abo-Ghorrah, M.(2015). Quorum sensing system in *Xanthomonas* citri pv. *mlavacearum* regulation of some virulence genes expression. Master thesis-Damascus University.

78- Newman, M.A., Lahaye, E.R., Parr, A., Daniels, M.J., Dow, J.M.(2002). Prior exposure to lipopolysacc haride potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. The Plant Journal 29, 487-495. DOI.10.1046/j.0960-7412.2001.00233x.

79- Newman, K.L., S,Chatterjee., K.A, Ho.,and S.E, Lindow.(2008). Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. Mol Plant Microbe Interact 21: 326–334.

80- Oliveira, J.C., Albuquerque, G.M.R., Souza, E.B,.(2011). Characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* causing cotton angular leaf spot in Brazil. Journal Of Plant Pathology 93(3):707-712.

81- Papenfot, K., Bassler, B.L. (2016). Quorum sensing signal- response in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Genet* . Doi. 10.1038/nrmicro.2016.89.

82- Pathak, R., G, Praveen., and S. K. Singh. (2016). Seed Priming-Mediated Induced Disease Resistance in Arid Zone Plants. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants, DOI 10.1007/978-981-10-0388-2_5.

83- Pierce disease and other designated pets and diseases of winegrapes. (2015). California Department of food and agriculture. Sacramento. CA 95814.

84- Poplawsky, A .R., Kawalek, M .D., Schaad, N .W. (1998). A xanthomonadin-encoding gene cluster for the identification of pathovars of *Xanthomonas campestris*. Mol Plant-Microbe Interact. **6:545**–552.

85- Poswal, M.A., and D, Erinle. (1983). A survey of extent of infection and contamination of cotton – seed market and commercial gin sample by *Xanthomonas malvacearum* (E.F.Smith) Dowson in the Northern states of Nigeria. (1983). Crop protection (1983) 2 (4), 473-481.

86- Qian, G., Zhou, Y., Zhao, Y., Song, Z., Wang, S., Fan, J., Hu, B., Venturi, V., and Liu, F. (2013). Proteomic Analysis Reveals Novel Extracellular Virulence-Associated Proteins and Functions Regulated by the Diffusible Signal Factor (DSF) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. American Chemical Society. dx.doi.org/10.1021/pr4001543.

87- Rai, R., Javvadi ,S., and Chatterjee, S. (2015). Cell-cell signalling promotes ferric iron uptake in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that contribute to its virulence and growth inside rice. Mol Microbiol. doi: 10.1111/mmi.12965.

88- Rai, R., Ranjan, M., Binod, B., and Chatterjee, S. (2012). Atypical Regulation of Virulence-Associated Functions by a Diffusible Signal Factor in *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae.* The American Phytopathological Society. pp. 789–801.

89- Rezzonico, F., Theo, H., Smits, M., and Duffy, B.(2012). Detection of AI-2 Receptors in genomes of Enterobacteriaceae Suggests a Role of Type-2 Quorum Sensing in Closed Ecosyst

ems.Sensors,6645-6665; doi:10.3390/s120506645.

90- Rigano, L.A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M.R., Abramowicz, L., Torres, P.S., Yun, M., Castagnaro. A.P., Oirdi, M.E., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J.M., Bouarab. K., and Vojnov, A.A. (2007). Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. Plant Cell 19: 2077–2089. DOI.10.1105/tpc.106.047944.

91- Robert, P. R., and J. Maxwell.(2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria.Cell press. doi:10.1016/j.tim.2010.12.003.

92- Ross, A.F.(1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. PubMed. Virology 14: 340–358.

93- Ryan, R. P., and Dow. J. M. (2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. Trends Microbiol. 19, 145–152.

94- Ryan, R.P., Dow, J.M. (2008). Diffusible Signal and interspecies communication in bacteria. Microbiology 154:1845-1858.

95- Ryan, R.P., An, S.Q., Allan, J., McCarthy, Y., and Dow, J.M. (2015). The DSF family of Cell–Cell Signals: An Exapanding Class of Bacterial Virulance Regulators. POLS.ppat.1004986.

96- Samal, B., and Chatterjee, S. (2019). New insight into bacterial social communication in natural host: Evidence for interplay of heterogeneous and unison quorum response. PLoS Genet 15(9): e1008395.pp.1-23.

97- Savchenko,T., Walley, J.W., Chehab, E.W., Xiao, Y ., Kaspi, R., Pye, M.F., Mohamed, M.E., Lazarus, C.M., Bostock, R.M., and Dehesh, K. (2010). Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. The Plant Cell 22, 3193–205. DOI.10.1105/tpc 110. 073858.

98- Schikora, A., Schenk, S.T., and Hartmann, A. (2016). Beneficial effects of bacteria–plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. Plant Mol Biol. (6):605-12. doi: 10.1007/s11103-016-0457-8.

99- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg,V.K., and Vidaver, A.K. (2006). Emended classificationtion of *Xanthomonas* pathogens on citrus. Syst. Appl. Microbiol 29, 690-5.

100-Schaad, N.W., J.B,Jones., and G.H,Lacy. (2001). *Xanthomonas*. In: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition .APS Press, St. Paul Minnesota.

قائمة المراجع

101- Schmid, N., Pessi, G., Deng, Y., Aguilar, C., Carlier, A.L., Grunau, A., Omasits, U., Zhang, L.H. et al. (2012). The AHL- and BDSF-dependent quorum sensing systems control specific and overlapping sets of genes in Burkholderia cenocepacia.DOI.10.1371/journal. pone.0049966.

102-Siciliano, F., Torres, P., Sendin, L., Bermejo, C., Filippone, P., Vellice, G., Ramallo, J., Castagnaro, A., Vojnov, A., and Marano, M. R. (2006). Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* pathogenesis in Citrus limon. Electron. J. Biotechnol. 9:200-204.DOI.10.4067/50717-345820060003000005.

103-Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman M.A., and Parrilli, M. (2005). The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. Journal of Biological Chemistry 280, 33660-33668.DOI.10.1074 /jbc.M506254200.

104- Suppiger, A., Schmid, N., Aguilar, C., Pessi, G., and Eberl, L. (2013). Two quorum-sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the Burkholderia cepacia complex. Virulence 4: 400-9.

105-Thiessen, L., Koenning, S. (2017). Bacterial blight of cotton. North Carolina State University Extension. http:/www.content.ces.ncsu.edu/.

106- Tian, X.Q., Wu, Y., Cai, Z., Qian,W.(2022). BDSF is a degradation-prone quorum sensing signal detected by the histidine kinase RpfC of Xanthomonas campestris pv. campestris. Biorrxiv.pp.1-32 Doi.org10.1101/2022.01.03.474871.

107- Torres, P.S., Malamud, F., Rigano, L.A., Russo, D.M., Marano, M.R., Castagnaro. A.P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J, M., and Vojnov, A.A.(2007). Controlled synthesis of the DSF cell–cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. Environmental Microbiology. 9(8), 2101-2109.DOI. 10.1111/j.1462-2920.2007.01332.x.

108-Upchurch, R.G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. Biotechnology Letters 30, 967–977.DOI.10.1007/s10529-008-9639-z.

109-Vanderleyden, D.R., and Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 28, 261e289.

110-Vallejos, V., van Noorden, G.E., Yuan, M., Mathesius, U. (2014). *A Sinorhizobium meliloti* –specific N-acyl homo serine lactone Quorum Sensing signal increase nodule number in

Medocago truncatula independent of autoregulation. Front Plant Sci 5;551.doi: 10.3389/fpls. 2014.00551.

111-Vicente, J. Cascon, T., Vicedo, B., Agustin, P.G., and Hamberg, M, (2012). Role 9-Lipoxygynase and a-Dioxygynase Oxylipin Pathways as Modulators of Local and Systemic Defense. Molecular Plant. Volume 5, Issue 4, Pages 914-928.

112- Vojnov A, A., Do, A.M., Amaral., J, Dow, M., Cai, A.P., and Marano, M. R. (2009). Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. Appl Microbiol Biotechnol 87:467–477.Doi.10.1007/s00253-010-2631-2

113- vonRad, U.(2008). Response of Arabidopsis thaliana to Nhexanoyl-DL-homo-serinelacto ne, a bacterial quorum-sensing molecule produced in the rhizosphere. Planta 229:73–85. doi: 101007/s00425-008-0811-4.

114-Wang, S., Lian, H.W., Yawen, H., Yunfeng, G., Wu, J-E., Dong, Y.H., He, C., Weng, L., Xu, J.L., Rai, L.T., Fang, X., and Zhang, L.H. (2004). A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. Molecular Microbiology. Doi :10. 1046./j.1365-2958.2003.03883.x.

115- Wang, S., Lian, H.W., Yawen, H., Yunfeng, G., Wu, J-E., Dong, Y-H., C,He., Weng, L., Xu, J-L., Fang, X., and Zhang, L-H. (2004).A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingd om structural analogues.Molecular Microbiology .doi:10. 1046.

116-Walley JW1, Kliebenstein, D.J., Bostock, R.M., Dehesh, K.(2013). Fatty acids and early detection of pathogens. Current Opinion in Plant Biology Volume 16, Issue 4, Pages 520-526.

117-Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005). Quorum Sensing Cell-to-Cell Communication in Bacteria .Molecular Biology.p21:319–46.DOI.10.1146/annurev.cellbio.21.012704. 131001.

118-Wheeler, B.E.J. (1969). An introduction to plant diseases of complex etiology. Annual Review of phytopathology 16, 379-402.

119-White, R.F., (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacoo. Pub.Med. NIH. DOI. 10.1016/0042-6822 (79)90019-9.

120-Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.(2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibacterial substances. Nature protocols. DOI.10.1038/nprot.2007.521.

قائمة المراجع

121-Xie, F., P, Chen., and L, Mao. (2014). Study on effect of oil- contaminated soil on seed germination. Advanced Materials research vol 864-867 (2014) pp 2532-2536.

122-Xing J., C.-K. Chin. (2000). Modification of fatty acids in eggplant affects its resistance to Verticillium dahliae Physiol Mol Plant Pathol, 56 (2000), pp. 217-225.

123- Xu ,J., Zhou, L., Venturi, V., He, Y.W., Kojima, M., Sakakibari, H., Höfte, M., and Vleesschauwer, D.De. (2015). Phytohormone-mediated interkingdom signaling shapes the outcome of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions. BMC Plant Biology. 15:10.DOI.10.1016/j .pbi. 2013.02.2008.

124- Xu, X., Ye, T., Zhang, W., Zhou, T., Zhou, X., Dai, W., Chen, S. (2021). Identification of FadT as a Novel Quorum Quenching Enzyme for the Degradation of Diffusible Signal Factor in *Cupravidus pinatubonesnsis* Strian HN-2. Int J Mol Sic. Doi:10.3390/ijms22189862.

125-Zhou, L., Wang, X.Y., Zhang, W., Sun, S., and He, Y.W. (2017). Extraction, Purification and Quantification of Diffusible Signal Factor Family Quorum-sensing Signal Molecules in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Bio Protoc. 207(6): e2190. Doi: 1021769/BioProtoc.2190.

126- Zhou, L., Zhang, L.H., Cámara, M., and He, Y.W. (2016). The DSF Family of Quorum Sensing Signals :Diversity, Biosynthesis, and Turnover. Cell press. Review. **DOI**.10.1016/j.tim.2016.11.013.

127-Zhou,L., Yu, Y., Chen, X., Abdeen Diab, A., Ruan, L., He, J., Wang, H., and He, Y.W. (2015). The Multiple DSF-family QS Signals are synthesized from Carbohydrate and Branched-chain Amino Acids via the FAS Elongation Cycle. *Sci. Rep.* 5, 13294; doi: 10.10 38/srep 13294.

قائمة المراجع

Abstract

The research conducted at the Faculty of Agriculture – Damascus University – Plant Bacterial Pathogens Laboratory. The aim of the research is study the effect of either The pure signal of DSF or DSF–family–containing extract of culture of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacerum* S101 (Xcm S101) has been studied on some virulence factors in Xcm S101 bacteria, and their effect on the development of Xcm S101 bacteria, germination capacity and defensive reactions in cotton plant. The results showed a decrease in ability of bacteria to grow, survival and motility when its treated with low concentrations of the pure signal of DSF(10 µM) or DSF–family–containing extract of culture(0.25 mg/mL). While high concentrations of the pure signal DSF (50, 100 µM) or concentration of DSF–family–containing extract of culture (1.25, 7.5 mg/mL) caused killing the bacteria, and its motility was inhibited. In addition, its ability to produce proteases was decreased, which it decreased in (0.25, 0.5, 1.25) mg/mL coefficients (20, 39, 84) % compared with the control after 120 hours of incubation. Also decrease in the production of exopolysaccarides, and biofilm formation was decrease at concentrations (10, 50) µM of the pure DSF signal, (57.5, 76%) compared to the control, and (0.25, 0.5, 1.25) mg\mL from DSF–family–containing extract of culture caused a decrease in biofilm formation (31.6, 60, 74)% compared to the control.

The results also showed an improvement in the germination of cotton seeds which treatment with the pure DSF signal at a concentration of 100 µM or the bacterial extract containing the DSF family signals at a concentration of mg/mL (0.25, 0.5), the germination percentage reached (91.67, 86.67, 83.33)%, respectively, while it was in the control 73.33%, and the results showed a decrease Pathogenicity of Xcm S101 bacteria in leaves of cotton plants whose seeds were treated with bacterial extract, and decreased growth of Xcm S101 bacteria in cotyledon leaves treated with seed soaking at 100 µM of pure DSF signal or 0.5 mg/mL of bacterial extract equivalent to (0.9, 2.14) logarithmically compared with the control after 4 days of infection, while the injection method decreased (2.19, 2.85) logarithmically compared to the control. The results also showed the accumulation of hydrogen peroxide production and stimulating the programmed cell death program in the plant tissues of the leaves which treatment with DSF pure or DSF–containing bacterial extract culture. The levels of peroxidase enzyme increased in the treated cotyledon leaves Either soaking the seeds, which reached nanoKatal/mg (85.9, 94.32) when using concentrations of 0.5 mg/mL of bacterial extract and 100 µM of pure DSF signal, respectively while it reached 37.55 nanoKatal\mg in the control, or by spray method, which reached (104.62 and 88.95) respectively, while it reached the control (63.22) after 48 hours of treatment.

Key words: QS/DSF, pathogenicity factors, improved seed germination, defense reactions, disease severity

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agriculture
Department of Plant Protection

Effect Bacterial Communication Signals of DSF- Family on Virulence Factors of *Xanthomonas citri* subsp. *mlavacearum* and on Host Plant

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

By

Ali Younes

Co-Supervisor
Prof. Manal Daghestani
Factually of Science
Damascus University

Supervisor
Prof. Mahmoud AboGurrah
Factually of Agriculture
Damascus University

2022-2021م
1444-1443هـ