جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

وزارة التعليم العالي
الهيئة العامة للتقانة الحيوية

دراسة العلاقة بين إفراز إنزيمات السيللولاز والقدرة الإمراضية لعزلات بكتيرية ممرضة للنبات

رسالة علمية أعدت لنيل درجة الماجستير في علوم وقاية النبات

(قسم وقاية النبات)

إعداد

م. ردينا أحمد غانم

(الهيئة العامة للتقانة الحيوية)

المشرف المشارك

د. محمد فواز العظمة

أستاذ في قسم وقاية النبات

كلية الزراعة– جامعة دمشق

المشرف

د. محمود أبو غرة

أستاذ مساعد في قسم وقاية النبات

كلية الزراعة– جامعة دمشق

2012

قُدّمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في وقاية النبات من

كلية الزراعة في جامعة دمشق

This thesis has been submitted as a partial fulfillment of the requirement for the degree of master in plant protection at the Faculty of Agriculture, Damascus University

تصريح

أُصرّح بأنّ هذا البحث " **دراسة العلاقة بين إفراز إنزيمات السيللولاز والقدرة الإمراضية لعزلات بكتيرية ممرضة للنبات**" لم يسبق أن قُبل لأي شهادة، ولا هو مُقدَّم حالياً للحصول على أية شهادة أخرى.

المُرَشّحة

ردينا أحمد غانم



تاريخ 5/ 3 /2012

DECLARATION

I hereby declare that this work " **The Correlation between Pathogenicity and Cellulolytic Enzymes Secretion in some Phytopathogenic Bacterial Isolates** " has not been accepted for any degree, nor submitted concurrently for any other degree.

Candidate name

Rudaina Ahmad Ghanem

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ : 5 / 3 /2012 وأجيزت أمام لجنة الحكم:

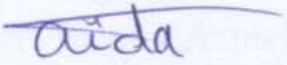
د. نجم الدين شرابي



د. محمود أبو غرة



د. عايدة جلول



شهادة

نشهدُ بأنَّ هذا العمل الموصوف في هذه الرسالة " **دراسة العلاقة بين إفراز إنزيمات السيللولاز والقدرة الإمراضية لعزلات بكتيرية ممرضة للنبات.**" هو نتيجة بحث علمي قامت به المُرشحة ردينا غانم بإشراف الدكتور محمود أبو غرة (أستاذ مساعد في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق) والدكتور محمد فواز العظمة (أستاذ في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق)، وإنّ الاستعانة بأعمال باحثين آخرين قد تم توثيقها في النص وفي قائمة المراجع.

المرشحة

ردينا غانم

بإشراف

د. محمود أبو غرة

د. محمد فواز العظمة

تاريخ : 2012 / 3 / 5

Certification

It is hereby certified that, the work described in this thesis " **The Correlation between Pathogenicity and Cellulolytic Enzymes Secretion in some Phytopathogenic Bacterial Isolates** " is the result of Ms. Rudaina Ghanem own investigations under the supervision of Dr. Mahmoud Abu-Ghorrah and Dr. Fawaz Azmeh (Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University). any reference to other researchers work has been duly acknowledged in the text and in the references list.

The Candidate

Rudaina Ghanem

Supervisors

Dr. Mahmoud Abu-Ghorrah

Dr.Fawaz Azmeh

كلمة شكر Acknowledgement

لا يسعني في نهاية هذا العمل إلا أن أقدم جزيل الشكر لكل من ساهم بخروجه للنور بهذا الكمال، وبدايةً أقدم كل امتناني لمن كانا مصدر كل سعادةٍ وجمالٍ في حياتي وسبب كل نجاحٍ وتألقٍ كنت قد حزت عليه؛ والدي الغالي، أمي الحبيبة.

كما أتقدم بالشكر الجزيل لأساتذتي الأفاضل؛ الدكتور محمود أبو غرة والدكتور فواز العظمة لإشرافهما على هذا البحث ولما قدماه من وافر معرفتهما وجميل عطائهما وجُلّ ثقتهما لأنجز هذا العمل بنجاح.

كذلك أتقدم بالشكر والامتنان للدكتورة عايدة جلول التي منحتني الكثير من النصح والوقت لتصويب هذا العمل وكانت خير دليل لتحقيق الغاية المرجوة من هذا العمل.

كما لم يكن هذا العمل لينجح لولا فضل الكثيرين، طيباً وإحساناً كعادة أهل العطاء دون انتظارٍ لشكرٍ أو امتنان وهنا أخص بالذكر كل من المهندس سومر العلي والمهندس شادي حمزة لتقديمهما يد العون لي على الدوام.

وأخيراً أتقدم بالشكر للهيئة العامة للتقانة الحيوية بكادرها الإداري والعلمي لاحتضانها هذا البحث ودعمها المادي والمعنوي، وعذراً إن أغفلت أحداً.

فهرس المحتويات

العنوان	الصفحة
فهرس الجداول	X
فهرس الأشكال	XII
الاختصارات Abbreviations	III X
الملخص	X IV
المقدمة	1
1- الدراسة المرجعية	3
1-1- البكتيريا كمسببات لأمراض النبات	3
1-1-1- أمراض التبقعات واللفحات	3
1-1-2- أمراض الذبول الوعائي	4
1-1-3- أمراض العفن الطري	5
1-1-4- التدرنات (الأورام) البكتيرية	6
1-1-5- التنكرزات والتقرحات البكتيرية	6
1-1-6- أمراض الجرب البكتيرية	6
1-2- عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا الممرضة للنبات	7
1-2-1- أنظمة الإفراز البكتيرية	7
1-2-2- السموم النباتية	8
1-2-3- عديدات السكر الخارجية	9
1-2-4- الهرمونات النباتية	9
1-2-5- عوامل التصاق البكتيريا بسطح العائل النباتي	10
1-2-6- عديدات السكر الدهنية	10
1-2-7- مستقبلات الحديد	10
1-2-8- الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية	11
1-2-8-1- الإنزيمات المحللة للبكتين	14
1-2-8-2- الإنزيمات المحللة للسلولوز	16

3-1- مبررات البحث وأهدافه	22
2- المواد والطرائق	23
2-1- مكان تنفيذ البحث	23
2-2- العزلات البكتيرية	23
2-2-1- تجديد العزلات البكتيرية	23
2-2-2- تحضير اللقاح البكتيري	25
2-2-3- قياس تركيز البكتريا	25
2-3- المادة النباتية	25
2-4- الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية الممرضة للنبات على تحليل CMC	26
2-4-1- وسط CMC	26
2-4-2- اختبار الهالة الشفافة	27
2-5- تحديد الفعالية المتخصصة للإنزيمات المحللة للسلولوز	27
2-5-1- تحضير الطافي (Supernatant) الحاوية على الإنزيم الخام	27
2-5-2- قياس تركيز البروتينات	27
2-5-3- قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase	29
2-5-4- قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase	33
2-5-5- قياس المحتوى الكلي من السكريات المختزلة	36
2-6- دراسة العلاقة بين إفراز البكتيريا للإنزيمات المحللة للسلولوز وقدرتها الإمراضية	37
2-6-1- اختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا الجنس *Erwinia* على شرائح البطاطا	37
2-6-2- اختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا *X. campestris* pv. *malvacearum*	38
2-6-3- اختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا الجنس *Bacillus*	38
2-7- التحليل الإحصائي	39
3- النتائج والمناقشة	40
3-1- اختبار الهالة الشفافة للكشف عن قدرة عزلات بكتيرية محلية ممرضة للنبات على تحليل CMC في وسط الزرع	40
3-2- تقدير الفعالية المتخصصة للإنزيمات المحللة للسلولوز وتباينها حسب الأنواع البكتيرية	46

3-2-1- تحديد منحى نمو وتطور البكتيريا مع مرور الزمن	46
3-2-2- تقدير المحتوى الكلي من السكريات المختزلة	47
3-2-3- تقدير تركيز البروتينات في الطافي (Supernatant)	48
3-2-4- تقدير الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase	49
3-2-5- تقدير الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase	51
3-2-6- مقارنة الأنواع البكتيرية في فعاليتها المتخصصة لكل من CMCase و BGase	52
3-3- تباين العزلات البكتيرية في فعاليتها المتخصصة لكل من CMCase وBGase	53
3-3-1- الجنس *Erwinia*	54
3-3-2- الجنس *Bacillus*	56
3-3-3- بكتيريا النوع *X. campestris* pv. *malvacearum*	56
3-4- دراسة العلاقة بين إفراز البكتيريا للإنزيمات المحللة للسلولوز وقدرتها الإمراضية	57
3-4-1- القدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Erwinia*	57
3-4-2- القدرة الإمراضية لعزلات *X. campestris* pv. *malvacearum*	64
3-4-3- القدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Bacillus*	68
4- الاستنتاجات	72
5- المقترحات	73
6- المراجع	74
7- ملحق الجداول	87

فهرس الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1	السموم النباتية التي تفرزها الأنماط الممرضة من بكتيريا *P. syringae*	8
2	قائمة بالإنزيمات المحللة لمكونات الجدر الخلوية	11
3	الإنزيمات المفرزة عبر نظام الإفراز الثاني عند بعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات	13
4	الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية التي تم اختبار دورها في القدرة الإمراضية بطريقة DNA- mediated mutation	14
5	الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية التي تفرزها بكتيريا العفن الطري من الجنس *Erwinia*	15
6	الإنزيمات اللازمة لتفكيك السلولوز إلى غلوكوز.	17
7	درجة الحموضة المثالية لإنتاج فعالية إنزيمية مرتفعة من CMCase من قبل بعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات	20
8	تأثير بعض المحاليل الملحية (بتركيز 1M)على فعالية الإنزيمات المحللة للسلولوز لدى بعض الأنواع البكتيرية الممرضة للنبات	21
9	العزلات البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة	24
10	تركيب وسط CMC المعدل	26
11	طريقة التخفيف والتراكيز النهائية لبروتين BSA حسب تعليمات الشركة الصانعة	28
12	طريقة التخفيف والتراكيز النهائية من الغلوكوز لرسم المنحني القياسي للغلوكوز	31
13	مراحل قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase لكل من العينات والشاهد والمحلول القياسي للغلوكوز	32
14	طريقة التخفيف والتراكيز النهائية من pNP المستخدمة لرسم المنحني القياسي	34
15	مراحل قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase لكل من العينات والشاهد والمحلول القياسي للغلوكوز	36
21	العزلات المختارة لإجراء اختبارات الفعالية الإنزيمية المتخصصة لكل منCMCase وBGase واختبار القدرة الإمراضية	56
16	كفاءة الأجناس البكتيرية المختبرة في تحليل CMC	42

17	كفاءة عزلات الجنس *Erwinia* في تحليل CMC	43
18	كفاءة عزلات الجنس *Bacillus* في تحليل CMC	44
19	كفاءة عزلات الجنس *Xanthomonas* في تحليل CMC	45
20	متوسط الفعالية الإنزيمية المتخصصة للعزلات المختبرة بعد 24 ساعة	53
21	العزلات المختارة لإجراء اختبارات الفعالية الإنزيمية المتخصصة لكل من CMCase و BGase واختبار القدرة الإمراضية	54
22	الفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس *Erwinia* بعد 24 ساعة	55
23	الفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس *Bacillus* بعد 24 ساعة	56
24	الفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات النوع *Xcm* بعد 24 ساعة	57
25	العلاقة بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس Erwinia	63
26	العلاقة بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات النوع Xcm	68
27	العلاقة بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس Bacillus	71

فهرس الأشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
1	البنية الأساسية لجزيئة السلولوز والروابط B-1,4 glucosidic linkages	16
2	المنحني القياسي لتراكيز متدرجة من BSA مقابل الامتصاصية عند 595nm	29
3	المنحني القياسي لتراكيز متدرجة من الغلوكوز مقابل الامتصاصية عند 540nm	31
4	المنحني القياسي لتراكيز متدرجة من pNP مقابل الامتصاصية عند 410nm	35
5	اختبار الهالة الشفافة للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على تحليل CMC	41
6	نمو وتطور البكتيريا المختبرة مع الزمن	47
7	التغيرات الكمية في تركيز RS مع الزمن للعزلات المختبرة	48
8	التغيرات الكمية في تركيز البروتينات مع الزمن للعزلات المختبرة	49
9	تغيرات الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase مع الزمن	51
10	تغيرات الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase مع الزمن	52
11	متوسط قطر التحلل على شرائح البطاطا المعداة بعزلات الجنس *Erwinia* على تركيز 10^7 بعد 24 ساعة	59
12	أعراض التحلل على شرائح البطاطا نتيجة العدوى ببكتيريا الجنس *Erwinia* بعد 24 ساعة من التحضين على تركيز 10^7	61
13	نمو وتطور بكتيريا Xcm في وحدة المساحة من النسيج النباتي المصاب	65
14	اختبار القدرة الإمراضية لعزلات Xcm على القطن	66
15	أعراض التحلل على ثمار البندورة المعداة ببكتيريا الجنس Bacillus	70
16	متوسط قطر التحلل على ثمار البندورة المعداة بعزلات الجنس Bacillus على تركيز 10^8 بعد 72 ساعة	71

Abbreviations

BGase	B-Glucosidase
BSA	Bovine Serum Albumin
CB	Citrate buffer
CFU	Colony Forming Unite
CMC	Carboxy Methyl Cellulose
CMCase	B-Endoglucanase
Cms	*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
CWDE	Cell Wall Degrading Enzymes
DFS	Diffusible signal factor
DNS	3,5- Dinitro salicylic acid
Eca	*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*
Ecc	*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*
Ech	*Erwinia chrysanthemi*
EPS	Extracellular Polysaccharides
EXG	Exoglucosidase
IU	International unite
KB	King's B medium
LPS	Lipopolysaccharides
OD	Optical density
Pel	Pectate lyases
Pme	Pectin Methyl Esterases
pNPG	para -Nitrophenol Glucopyronoside
pPN	para- Nitrophenol
PS	Polysaccharides
Pss	*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
RS	Reducing sugar
Xcc	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
Xcm	*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*

الملخص:

تعد الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE) من أهم عوامل القدرة الإمراضية لدى البكتيريا الممرضة للنبات وبخاصة مسببات الأعفان الطرية (Soft Rots)، وقد هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن قدرة بعض العزلات البكتيرية الممرضة للنبات والتي تتبع أنواعاً وأجناساً مختلفة على إفراز الإنزيمات المحللة للسلولوز، وتقييم دور هذه الإنزيمات في قدرتها الإمراضية.

أجري البحث خلال الفترة 2009–2011 على 51 عزلة، منها 15 عزلة تابعة للجنس *Erwinia* و12 عزلة للجنس *Xanthomonas* و11 عزلة للجنس *Bacillus* إضافة إلى 8 عزلات من النوع *Agrobacterium tumefaciens* و5 عزلات تتبع *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*. وقد تم الكشف عن قدرة العزلات على إفراز الإنزيمات المحللة للسلولوز من خلال زراعتها على وسط Carboxy Methyl Cellulose (CMC) حيث قدرت كفاءة العزلات بحساب نسبة قطر الهالة الشفافة إلى قطر المستعمرة وقد أظهرت النتائج تفوق عزلات الجنس *Erwinia* تلتها في الأهمية عزلات الجنس *Bacillus* بينما جاء الجنس Xanthomonas في المرتبة الأخيرة حيث لم تسجل عزلات الأنواع *X. translucens* المسببة لمرض التخطط البكتيري على النجيليات و*A.tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجي و*P. savastanoi* pv. *savastanoi* المسببة لمرض سل الزيتون أي نتيجة إيجابية.

وبمقارنة العزلات التابعة لكل جنس فيما بينها تفوقت عزلات تحت النوع *Erwinia carotovora* subsp *carotovora* (*Ecc*) بتحليلها لمادة CMC مقارنة مع كل من*E. chrysanthemi* (*Ech*) و *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* (*Eca*). وقد تفوقت العزلة A10.1 التي تتبع *Ecc* على باقي العزلات في كفاءتها لتحليل CMC بمتوسط كفاءة قدره 3.85، كما تفوقت بفعاليتها المتخصصة لكل من إنزيمي Endoglucanase (CMCase) و β-Glucosidase (BGase) بمتوسط قدره 0.522، 0.263 (IU/mg protein) على التوالي، حيث تم تقديرها بالاعتماد على الطرق اللونية باستخدام المطياف الضوئي ، وقد لوحظ تراكم الإنزيمات CMCase و BGase في آواخر طور النمو الأسي وخلال طور الثبات للبكتيريا. كما تأثر تراكم الإنزيمات سلباً بارتفاع تركيز الغلوكوز في الرشاحة نتيجة تحلل CMC. وأظهرت نتائج اختبار القدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Erwinia* على شرائح البطاطا تزايد شراسة البكتيريا بارتفاع

تركيز اللقاح حيث أعطت أكبر قطر للتحلل على تركيز 10^7 (CFU/ml) بعد 24 ساعة من التحضين. وقد تفوق النوع *Ech* على كل من *Ecc* و *Eca*، حيث سجلت العزلة EchD أعلى قيمة لقطر التحلل على تركيز 10^7(CFU/ml) قدره 26.8 mm . وتبين بالتحليل الإحصائي وجود ارتباط معنوي بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية المتخصصة مما يشير إلى دور إنزيمات CMCase و BGase في القدرة الإمراضية لعزلات كل من *Ecc* و *Eca* بينما بدا هذا الدور ثانوياً لدى عزلات *Ech*.

وأظهرت جميع عزلات الجنس *Bacillus* كفاءة عالية لتحليل CMC حيث كانت العزلة O127-2-2 الأفضل بمتوسط قدره 3.24 كما أعطت أعلى فعالية إنزيمية لكل من CMCase و BGase (0.48 و 0.28 IU/mg protein) على التوالي) مقارنةً مع باقي عزلات هذا الجنس، إلا أنها وعلى خلاف عزلات الأجناس الأخرى أعطت فعالية إنزيمية متزايدة مع الزمن وبازدياد تركيز الغلوكوز في الوسط. كما أظهر اختبار القدرة الإمراضية على ثمار البندورة تزايد أقطار التحلل بارتفاع تركيز اللقاح البكتيري إلى حد معين هو 10^7(CFU/ml). وقد تفوقت العزلة O127-2-2 بإمراضيتها على ثمار البندورة على باقي عزلات الجنس *Bacillus* بقطر تحلل قدره 50.23 mm وقد وجد ارتباط معنوي قوي بين الفعالية المتخصصة لكل من CMCase و BGase والقدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Bacillus* مما يشير إلى الدور المهم الذي تقوم به في القدرة الإمراضية لأنواع هذا الجنس.

من جهة أخرى أعطت جميع عزلات النوع *Xcm* كفاءة متقاربة في تحليل CMC باستثناء العزلة RG1-1 التي كانت الأقل كفاءة، بينما أظهرت العزلة RG3-1 أعلى كفاءة وقدرها 2.55، وبينت نتائج اختبار الفعالية الإنزيمية وجود فروق معنوية بين العزلات في الفعالية المتخصصة لكل من CMCase و BGase حيث تفوقت العزلة RG2 على باقي العزلات المختبرة. ويبدو أن دور الإنزيمات المحللة للسلولوز ثانويا في القدرة الإمراضية لبكتيريا *Xcm* حيث أعطت العزلتان A10.1 و RG1-1 أعراضاً نموذجية على نباتات القطن بالرغم من انخفاض فعاليتها الإنزيمية مقارنةً مع العزلة RG2 التي لم تتمكن من إحداث أعراض التبقع النموذجية على أوراق القطن.

لقد تباينت أهمية الإنزيمات المحللة للسلولوز في القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية المختبرة وهذا يعود إلى اختلاف البكتيريا الممرضة للنبات في طريقة مهاجمتها للنبات العائل وطبيعة حياتها ضمن النبات أو بعيدةً

عنه إلا أن معظمها أعطى فعالية إنزيمية متخصصة عالية على اختلافها، فقد تميزت الأنواع وتحت الأنواع المسببة للأعفان الطرية وأمراض التبقع واللفحة التي تتطلب تدمير الجدر الخلوية عن مسببات أمراض أخرى كالتدرن التاجي وسل الزيتون بنشاطها الإنزيمي، الأمر الذي يمكن الاستفادة منه لإنتاج هذه الإنزيمات كمياً نظراً لأهميتها في عدة مجالات تطبيقية وصناعية، وذلك من خلال استخدام سلالات مختارة ومحسنة من البكتيريا وإكثارها بالتخمير.

المقدمة:

يقدر عدد الأنواع البكتيرية المصنفة حتى الآن بحوالي 7100 نوع منها 150 نوع فقط ممرض للنبات وبالرغم من ذلك فإنها تسبب خسائر اقتصادية هامة للمحاصيل حول العالم قد تصل إلى 12–15 % سنوياً (Buonaurio, 2008) حيث يؤدي بعضها لموت النبات كلياً ضمن مساحات واسعة مثل بكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة للفحة النارية على التفاحيات والتي تقضي على الكثير من الأشجار سنوياً وخاصةً في شمال أميركا وأوروبا (Perombelon, 1992) وبكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *citri* المسببة لتقرح الحمضيات الذي أدى لإبادة ملايين الأشجار في فلوريدا على مدى سنوات متتالية خلال القرن الماضي (Agrios, 2005)، كذلك يعتبر مرض التقرح البكتيري على البندورة الذي تسببه بكتيريا *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* من أهم الأمراض البكتيرية على هذا المحصول حيث يسبب خسائراً في الإنتاج قد تصل إلى 70% (Sobiczewski, 2008) كما تقدر الأضرار الاقتصادية لبكتيريا العفن الطري (Soft Rot Bacteria) على درنات البطاطا المخزنة بحوالي 50– 100 مليون دولار سنوياً (Kumar *et al*., 1991).

وتعزى الأهمية الاقتصادية للبكتيريا الممرضة للنبات إلى امتلاكها لميزات على المستوى الجزيئي والخلوي تسمى عوامل القدرة الإمراضية تستخدمها البكتيريا لمهاجمة النبات العائل والتغلب على ردود فعله الدفاعية ومن ثم الانتشار ضمن الأنسجة النباتية (Salmond, 1994)، وتعتبر الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية إحدى عوامل القدرة الإمراضية الهامة، وخاصةً لمسببات العفن الطري، حيث تقوم بدور هام في تفكيك مكونات جدار الخلية النباتية الذي يعد العائق الأول أمام البكتيريا بعد دخولها إلى الفراغات بين الخلوية مما يمكنها من الوصول إلى سيتوبلاسم الخلية النباتية واستخدام نواتج تحلل البوليمرات كمصدر للطاقة وبالتالي الاستمرار في إصابة (غزو) الأنسجة النباتية وتطور الأعراض لمرحلة قد تؤدي لموت النبات بالكامل (Agrios, 2005).

تنتج البكتيريا الممرضة للنبات مجموعة متنوعة ومتعددة من الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية ومن أهمها الإنزيمات المحللة للبكتين والسلولوز حيث تساهم الإنزيمات المحللة للبكتين بتفكيك الصفائح الوسطى التي تربط الجدر الخلوية معاً والمواد البكتينية المكونة لهذه الجدر، بينما تقوم الإنزيمات المحللة للسلولوز

بتفكيك الألياف السلولوزية التي تمثل الهيكل الأساسي لجدار الخلية النباتي وهكذا تتحلل بوليمرات النبات إلى مواد بسيطة يسهل على البكتيريا التغذي عليها (Lagaert *et al.,* 2009).

1- الدراسة المرجعية

1-1- البكتيريا كمسببات لأمراض النبات (Bacteria as plant pathogen):

يتعرض النبات للإصابة بالعديد من الممرضات (ومن بينها البكتيريا) لغناه بالماء والمواد الغذائية الضرورية لنمو واستمرار الكائنات الحية على سطح الكرة الأرضية وتعتبر الأمراض التي تسببها البكتيريا ذات أهمية اقتصادية للمحاصيل الزراعية حول العالم بسبب صعوبة مكافحتها وسهولة انتشارها وخاصةً في المناطق المدارية وشبه المدارية بسبب ظروف الرطوبة والحرارة الملائمة (Agrios, 2005).

وتتبع البكتيريا الممرضة للنبات إلى ثلاث شعب من أصل 21 شعبة ضمن البكتيريا هي *Proteobacteria* و *Actinobacteria* و *Firmicutes* (Buonaurio, 2008) وقد حظيت البكتيريا التابعة لشعبة *Proteobacteria* (البكتيريا سالبة غرام) باهتمام الباحثين بسبب مداها العائلي الواسع وخطورة الأضرار الناجمة عنها إضافةً لقابليتها للدراسة، وهي تضم أجناساً هامة مثل *Agrobacterium* و *Erwinia* و *Xanthomonas* و *Pseudomonas* التي تسبب أمراضاً مختلفة على النبات مثل اللفحات والتبقعات والتقرحات والذبول الوعائي والأورام والأعفان الطرية على الدرنات والثمار المخزونة (Van sluys *et al.*, 2002) كما تسبب البكتيريا موجبة الغرام التي تتبع الأجناس *Clavibacter* و *Streptomyces* أضراراً هامة على المحاصيل الزراعية تؤدي أحياناً لخسائر اقتصادية فادحة (Hogenhout and Loria, 2008). وحسب Janse (2005) يمكن تقسيم أمراض النبات البكتيرية بالاعتماد على الأعراض التي تحدثها البكتيريا إلى المجموعات التالية:

1-1-1- أمراض التبقعات واللفحات Bacterial Spots and Blights:

- التبقع الزاوي على القطن:

Angular Leaf Spot and Bacterial Blight of Cotton

ينتج هذا المرض عن الإصابة بالبكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* ويعتبر من الأمراض الخطيرة في مناطق زراعة القطن (*Gossypium hirsutum*) حيث يسبب خسائر في الإنتاج وصلت في بعض مناطق إفريقيا وآسيا لنسب غير طبيعية (10- 30%) وازدادت النسبة لتصل إلى 50% أو أكثر خلال بعض السنوات، لكن في الفترات القليلة الماضية أصبحت الخسائر أقل قدرت بنسبة 1% فقط في الولايات المتحدة الأميركية (Bayles and Verhalen, 2007). تبدو الأعراض على البادرات بشكل

بقع مائية صغيرة على السطح السفلي للأوراق الفلقية والأوراق الحقيقية الفتية تصبح فيما بعد بقع بنية مزوّاة تؤدي في النهاية لاصفرار الأوراق ثم سقوطها، بينما تظهر الأعراض على جوزات القطن في البداية بشكل بقع مائية زيتية صغيرة غير منتظمة تتحول إلى بقع سوداء غائرة (Agrios, 2005).

- أمراض اللفحات والتبقعات البكتيرية على أوراق النجيليات:

Bacterial Leaf Spots and Blights of Cereals

تهاجم أنواع مختلفة من بكتيريا *Pseudomonas* و *Xanthomonas* محاصيل الحبوب المزروعة حول العالم مسببةً انخفاضاً حاداً في إنتاجيتها قد يصل في بعض الحقول لنسبة 11- 29% (Tillman *et al.,* 1999)، وتنتشر هذه الأمراض حيث يزرع القمح حول العالم وتظهر الأعراض بشكل بقع مائية طولية صغيرة تمتد وتتحد تدريجياً ثم تصبح صفراء ومن ثم بنية اللون وقد تؤدي الإصابة لتماوت الأوراق بدءاً من قمتها باتجاه الأسفل (Duveiller and Meraite, 1993) وتعتبر الحبوب المصابة مصدراً رئيسياً للقاح الأولي إضافةً لبقايا المحاصيل المصابة وقد تقضي فترة التشتية على عوائلها العشبية المعمرة.

1-1-2- أمراض الذبول الوعائي Bacterial vascular wilt:

يصاب عديد من المحاصيل الحقلية والخضار والأشجار المثمرة بأمراض الذبول الوعائي التي تسببها البكتيريا مما يؤدي لفقد في الإنتاج يصل أحياناً لنسبة 100% خاصة عند توفر الظروف المثالية لتطور المرض (Janse, 2005) وتعزى أعراض الاصفرار والذبول إلى إنتاج البكتيريا لعديدات السكر الخارجية Extracellular Polysccharides (EPS) التي تعيق انتقال الماء عبر الأوعية الناقلة، إضافةً للسموم التي تنتشر ضمن النبات وتؤثر في مواقع أخرى بعيدة عن مناطق العدوى حيث توجد الخلايا البكتيرية (Huang and Allen, 2000).

تنتج أمراض الذبول الوعائي عن الإصابة بأنواع بكتيرية محددة تتبع للأجناس *Pseudomonas* و *Xanthomonas* و *Erwinia* و *Clavibacter* (Nelson and Dickey, 1970).

1-1-3- أمراض العفن الطري Bacterial Soft Rots:

تعد أمراض العفن الطري شائعة الحدوث على الأنسجة النباتية الرطبة للخضار والفواكه أثناء التخزين وأحياناً أثناء النقل، كما يمكن أن تصيب النباتات النامية في الحقل أو ما بعد الحصاد وتنتج عن بكتيريا تتبع أجناس مختلفة وأهمها *Erwinia* و*Pseudomonas* و*Bacillus* و *Clostridium* (Lund, 1983; Liao *et al.,* 2003).

تعد الجروح المنفذ الأساسي لدخول هذه البكتيريا إلى الأنسجة النباتية حيث تتكاثر في الفراغات بين الخلوية منتجةً أنواع مختلفة من الإنزيمات المحللة للصفائح الوسطى التي تربط الخلايا النباتية معاً مما يؤدي إلى طراوة الأنسجة المصابة، ثم تقوم البكتيريا بتفكيك الجدر الخلوية النباتية بواسطة إنزيماتها مما يفقد خلايا النبات محتوياتها وبالتالي تحلل النسيج النباتي بالكامل وهذا يسمح بتطور الأعراض خلال ساعات قليلة عند التخزين بظروف ملائمة لتطور البكتيريا أو حتى عند التسويق وهذا ما يجعل الخسائر التي تسببها هذه البكتيريا أحياناً أكثر مما تسببه أي أنواع بكتيرية أخرى (Hélias *et al.,* 2000).

تصنف بكتيريا العفن الطري ضمن البكتيريا التي تقتل العائل (Necrotrophes) وذلك لاعتماد قدرتها الإمراضية على إنتاج إنزيمات محللة للجدر الخلوية وتستخدم هذه الإنزيمات للحصول على مصادر الطاقة من الأنسجة النباتية (Toth *et al.,* 2003)، وتعد أنواع الجنس *Erwinia* الأكثر أهمية لأن بكتيريا الأجناس الأخرى تعتبر ممرضات ثانوية حيث أنها تهاجم الأنسجة النباتية المصابة مسبقاً بممرضات أخرى بكتيرية أو فطرية وتعيش معظم حياتها مترممة في التربة، كما يتميز بعضها بمدى عوائلي واسع مثل *Ecc* و *Ech* بينما تقتصر *Eca* على البطاطا إضافةً لكونها تفضل درجات الحرارة المنخفضة نسبياً مقارنةً مع Ecc، وبالمقابل تنمو بكتيريا *Ech* وتتطور ضمن مدى حراري واسع من 5 – 35°س (Perombelon, 1992) وقد تسبب أنواع الجنس *Bacillus* في بعض الأحيان أضرار هامة على البندورة والبطاطا وأوراق التبغ في المخازن حيث سببت بكتيريا *B. pumilus* في إحدى السنوات خسارة قدرت بنسبة 30 % من إنتاج البطاطا في مالي (Babana *et al.,* 2010). كذلك الأمر بالنسبة لبكتيريا *P. fluorescens* التي تصيب عوائل نباتية مختلفة حيث تسبب مرض Pink eye على البطاطا و Slippery Skin على البصل (Liao *et al.,* 1993).

1-1-4- التدرنات (الأورام) البكتيرية Bacterial Galls:

تتميز بعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات بقدرتها على إحداث خلل في وظيفة الهرمونات النباتية (منظمات النمو) فتؤدي لظهور نموات غير طبيعية على شكل تدرنات (أورام) على أجزاء النبات المختلفة، وتتبع الجنس *Agrobacterium* وأنواع محددة من الأجناس *Pseudomonas* و *Rhizobacter* و *Rhodococcus* (Agrios, 2005)، حيث تسبب بكتيريا

A. tumefaciens مرض التدرن التاجي على العديد من الأشجار والنباتات العشبية والتي تتبع إلى 140 جنس ضمن أكثر من 60 عائلة نباتية ويصيب بشكل خاص أشجار التفاحيات واللوزيات والعنب والصفصاف (Thomashow *et al.,* 1980)، وتعزى هذه الأعراض إما إلى قدرة البكتيريا (من خلال التطفل الوراثي) على تحريض خلايا النبات على إنتاج الهرمونات النباتية المسؤولة عن النمو بمستويات عالية مما يؤدي لانقسام الخلايا عشوائياً وبالتالي تشكل التدرنات في حال الإصابة ببكتيريا *A. tumefaciens* (Nester, 2000) أو إلى قدرة البكتيريا على إنتاج هذه الهرمونات كما هو الحال لدى *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* المسببة لمرض سل الزيتون والتي تفرز الأوكسينات والسيتوكينات التي تعمل على تحفيز انقسام الخلايا وتشكل الأورام (Comai *et al.,* 1982).

1-1-5- التنكرزات والتقرحات البكتيرية Bacterial Necroses and Cankers:

بالرغم من وجود عدد قليل من أمراض التقرحات البكتيرية إلا أنها واسعة الانتشار حول العالم وذات أهمية اقتصادية بالغة (Gottwald *et al.,* 2002) وتسببها أنواع بكتيرية محددة تتبع الأجناس *Xanthomonas* و *Pseudomonas* و *Erwinia*، حيث يعتبر مرض اللفحة النارية من بين أهم هذه الأمراض والأكثر وبائية على أشجار التفاح والإجاص حول العالم وخاصة في المناطق المعتدلة ذات المناخ الرطب نسبياً.

1-1-6- أمراض الجرب البكتيري Bacterial Scabs:

تنتج عن إصابة الأجزاء النباتية (ضمن التربة) وخاصة الدرنات بأنواع بكتيرية تتبع الجنس *Streptomyces* والتي تتميز عن بقية الأنواع البكتيرية الممرضة للنبات بأن لها شكلاً خيطياً متفرعاً (مثل

الهيفات الفطرية) حيث تشكل الخيوط الهوائية سلسلة من 3 أبواغ أو أكثر، ومن أهم أنواعها: *S. scabies* الذي يصيب البطاطا والفجل والشوندر وغيرها من المحاصيل الجذرية إضافةً إلى بكتيريا *S. ipomoeae* التي تصيب البطاطا الحلوة (Faucher *et al.,* 1993).

1-2- عوامل القدرة الإمراضية للبكتيريا الممرضة للنبات:

تمضي معظم البكتيريا الممرضة للنبات دورة حياتها ضمن النبات العائل كمتطفلات إما في الفراغات بين الخلوية Apoplast أو في الأوعية الخشبية الناقلة Xylem بينما تكون بطور غير متطفل على سطح النبات Epiphyte أو بشكل مترممات Saprophytes عندما تكون في التربة أو في بقايا المحاصيل بعيداً عن مضيفاتها الحية (Beatti and Lindow, 1994)، وحتى تصل البكتيريا الممرضة للنبات إلى داخل الأنسجة النباتية لابد لها من استخدام آليات معينة تجعلها قادرة على إحداث العدوى تسمى بعوامل القدرة الإمراضية والتي تسمح للبكتيريا بالتحرك باتجاه النبات العائل (باستخدام السياط) (Chesnokova *et al.,* 1997) والدخول عبر الجروح والفتحات الطبيعية للنبات (الثغور والعديسات والمسام والندبات الورقية والغدد الرحيقية) إلى الفراغات بين الخلوية ومن ثم التغلب على العوائق التي تعترضها مثل الجدر الخلوية النباتية إضافةً للمركبات ذات الفعالية المضادة للميكروبات التي يشكلها النبات بعد اكتشافه للممرضات (Hammond-Kosack and Jones, 1996) وتتضمن عوامل القدرة الإمراضية أي جزيئة موجودة على السطح الخارجي للخلية البكتيرية أو تنقل من داخل الخلية إلى الوسط الخارجي بحيث تؤثر على الخلايا النباتية بشكل مباشر أو غير مباشر (Salmond, 1994) ومن أهمها:

1-2-1- أنظمة الإفراز البكتيرية Bacterial Secretion Systems:

تستخدم البكتيريا سالبة الغرام آليات معقدة لنقل البروتينات وجزيئات مختلفة إلى الفراغات بين الخلوية أو سيتوبلاسم الخلية النباتية تسمى أنظمة الإفراز البكتيرية وحتى الآن وجد لها 5 أنماط (Desvaux *et al.,* 2004) والتي تختلف عن بعضها البعض باختلاف الجزيئات التي تنقل عبرها أو التي تدخل في بنيتها أو باختلاف آلية عملها (Thanassi and Hultgren, 2000).

كما تتباين البكتيريا الممرضة للنبات بأنظمة الإفراز التي تعتمد عليها لنقل البروتينات إلى خارج الخلية حيث تعتمد البكتيريا المسببة لـلأورام *Tumorigenic Agrobacterium* على نظام الإفراز الرابع TⅣ-SS بينما تعتمد بكتيريا العفن الطري من الجنس *Erwinia* على نظام الإفراز الثاني T Ⅱ-SS أما البكتيريا المسببة لتموّت الأنسجة والأمراض الوعائية مثل بكتيريا *Pseudomonas* و *Xanthomonas* فتعتمد على نظام الإفراز الثالث TⅢ-SS (Salmond, 1994).

1-2-2- السموم النباتية Phytotoxins:

ينتج عديد من العوامل الممرضة للنبات سموماً نباتية غير متخصصة ذات وزن جزيئي منخفض لها دور فعّال في القدرة الإمراضية، فهي إما تؤدي لموت خلية العائل مباشرةً فتسبب أعراض التموّت (Necrosis) أو تؤثر على العمليات الحيوية الخلوية ووظائفها فتظهر أعراض اصفرار على النبات. وتعتبر السموم النباتية التي تنتجها الطرز البكتيرية pathovars للنوع *P. syringae* الأكثر دراسة كما يوضح الجدول1 (Alfano and Collmer, 1996)، حيث أشارت الدراسات إلى تناقص شراسة *P. syringae* pv. *syringae* الطافرة التي فقدت قدرتها على إنتاج Syringomycin أو Syringopeptin على ثمار الكرز غير الناضجة، بينما لم تتأثر شراسة البكتيريا *P.s. syringae* B728 على الفاصولياء (Bender *et al.,* 1999). كما أثبت Tamura وزملاؤه (1998) أن لسم الكورونـاثين دور فعّال في امتداد منطقة الإصابة ببكتيريا *P. syringae* وتطور أعراض الاصفرار وتضاعف البكتيريا في الأوراق المصابة.

جدول 1: السموم النباتية التي تفرزها الأنماط الممرضة من بكتيريا *P. syringae*.

Toxin	Pathovar	Structure Type	Function or Target	Symptoms
Syringomycin	*syringae*	Cyclic lipodepsipeptide	Forms pores in plasma membrane	Necrosis
Syringopeptin	*syringae*	Cyclic lipodepsipeptide	Forms pores in plasma membrane	Necrosis
Coronatine	*tomato, glycinea,* others	Polyketide and cyclized amino acid	Molecular mimic of plant signal molecule methyl jasmonate	Chlorosis
Tagetitoxin	*tagetis*	Hemithioketal	Inhibitor of chloroplast RNA polymerase	Chlorosis
Phaseolotoxin	*phaseolicola*	Sulpho-diamino-phosphinyl tripeptide	Inhibitor of ornithine carbamoyltransferase	Chlorosis
Tabtoxin	*tabaci* and several others	β-lactam–containing dipeptide	Inhibitor of glutamine synthetase	Chlorosis

Source: (Alfano and Collmer, 1996)

1-2-3- عديدات السكر الخارجية Extracellular Polysaccharides(EPS):

وهي عبارة عن بوليمرات كربوهيدراتية تفرزها البكتيريا بشكل كبسولة أو طبقة مخاطية Slime، تسهل امتصاص العناصر المعدنية والمغذيات، كما أنها مركبات شرهة للماء وبالتالي تقوم بحماية البكتيريا من الضغوط اللاحيوية التي تواجهها عندما تكون على سطح النبات Epiphytes أو بحالة مترممة Saprophyte مثل الجفاف كما تحميها من الجزيئات السامة أثناء وجودها ضمن النبات بحيث تحفز بدء العدوى في الأنسجة النباتية والانتشار فيها وتساهم في تطور أعراض الذبول والبقع المائية على الأجزاء النباتية المصابة (Denny, 1995).

وتعتبر EPS من أهم عوامل شراسة البكتيريا *Ralstonia solanacearum* المسببة للذبول الوعائي على الباذنجانيات حيث أنها تنتج كميات كبيرة من EPS(EPS1) ذات وزن جزيئي مرتفع و pH حامضي ولزوجة عالية بحيث تمنع انتقال الماء ضمن النبات فتسبب أعراض الذبول ثم موت النبات (Kao *et al.,* 1992) وإن أي طفرة في EPS1 سوف تخفف من أعراض الذبول وتخفض قدرة البكتيريا على مهاجمة الأنسجة الوعائية والانتقال ضمن جذور النبات مقارنةً مع السلالة الأصلية (Denny and Baek, 1991; Saile, *et al.,* 1997).

1-2-4- الهرمونات النباتية Phytohormon:

يتم تنظيم عمليات النمو في النبات تحت تأثير ما يسمى الهرمونات Hormone أو منظمات النمو Growth regulator والتي توجد في النبات بتراكيز محددة بحيث يؤدي أي تغيير في مستوياتها الطبيعية إلى خلل في نمو النبات ومن أهمها Auxins (IAA) و Cytokinins و Gibberellins و Ethylens (Agrios, 2005). وقد وجد أن لبعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات القدرة على إحداث تغييرات في تراكيز الهرمونات النباتية من خلال زيادة أو تثبيط إنتاجها، حيث تعتمد القدرة الإمراضية لبكتيريا *P. savastanoi* pv. *nerri* و *P. savastanoi* pv. *savasranoi* و *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* على إنتاج حمض الإندول الخلي (IAA: Indol 3-Acetic acid) الذي يحرض على انقسام الخلايا وظهور أعراض التدرنات على النباتات المصابة (Surico and Iacobellis, 1992; Manulis and Barash, 2003) بينما تحرّض بكتيريا *A. tumefaciens* خلايا النبات على إنتاج IAA بعد نقل T-DNA إلى جينوم النبات (Sheng and Citovsky, 1996).

1-2-5- عوامل التصاق البكتيريا بسطح العائل النباتي

Bacterial adhesion to plant surfaces

لا تعتبر آليات الالتصاق بسطح العائل ضرورية لمعظم أنواع البكتيريا الممرضة للنبات إلا عندما تتحرك خلال الأوعية الخشبية لكنها تعتبر خطوة مهمة ضرورية لحدوث العدوى، حيث يتطلب انتقال T-DNA لبكتيريا *A. tumefaciens* عبر TIVSS لآليات الالتصاق بسطح الخلية النباتية (Agrios, 2005) ويتم الالتصاق على خطوتين: حيث يتم في الخطوة الأولى ارتباط عديدات السكر Polysaccharides (PS) البكتيرية (مثل Cyclicglucan الذي تشفره *chvA* و*chvB*) مع PS الموجودة على سطح العائل، ويكون الارتباط ضعيفاً قابلاً للفك، وقد وجد أن أي طفرة في مورثات *chv* ستؤدي لخفض ارتباط البكتيريا بسطح العائل وبالتالي تلغي حدوث العدوى وتشكل الأورام (Brencic and winans, 2005) ويصبح الارتباط في الخطوة الثانية محكماً بحيث يصعب فكه نتيجة تشكل السلولوز الذي يساعد على التصاق البكتيريا بالنسيج النباتي (Matthysse, 1983).

1-2-6- عديدات السكر الدهنية Lipopolysaccharides (LPS):

تعتبر LPS جزء من الغشاء الخارجي للبكتيريا سالبة الغرام وتتألف من 3 مكونات أساسية هي من الداخل إلى الخارج: O-specific sidechain, Oligosaccharide core, lipid A (Feulner.2003) حيث تقوم بدور هام في تخصص إصابة البكتيريا لعوائل نباتية محددة وتساهم أيضاً في القدرة الإمراضية لبعض الأنواع البكتيرية مثل *Eca* (Toth *et al.*, 1999) فهي تنشّط البروتينات المرتبطة بالإمراضية في النباتات المصابة مثل Glucanases كما تثبط حدوث فرط الحساسية وقد وجد أن تعطيل المورثات المسؤولة عنها يخفض شراسة البكتيريا (Agrios, 2005).

1-2-7- مستقبلات الحديد (السيدروفورات) Siderophores :

لا يمكن للبكتيريا الممرضة للنبات استهلاك الحديد المتوفر في الأنسجة النباتية إلا من خلال إنتاج مركبات تحتجز الحديد الموجود في الوسط الخارجي (Siderophores) إضافةً لمستقبلات لها على السطح الخارجي للخلية البكتيرية، وتنتج بكتيريا *Ech* ثلاثة أنواع من Siderophores وهي: Chrysobactin و Enterobactin و Ferrichrome والتي تلعب دوراً هاماً في العدوى الجهازية للنبات (Barras *et al.*, 1994) كما أنها تحمي البكتيريا من الأشكال الفعالة للأكسجين ضمن النبات (Agrios, 2005).

1-2-8- الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية: Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE)

يعتبر جدار الخلية النباتية العائق الأول الذي يواجه العوامل الممرضة عند مهاجمتها للنبات والذي يتألف من 10% بروتين و90% PS والتي تشكل مصدراً أساسياً للكربون بالنسبة لممرضات النبات وتتضمن 3 أنواع من PS هي 35% بكتين و30% سلولوز و30% هيمي سلولوز، حيث يشكل السلولوز والهيمي سلولوز شبكة متداخلة من الألياف الدقيقة ضمن قالب هلامي من البكتين، الأمر الذي يعطي جدار الخلايا النباتية صلابتها ومتانتها (Lagaert *et al.,* 2009)، وبما أن البكتيريا الممرضة للنبات غير قادرة على تطبيق قوى فيزيائية تستطيع من خلالها تفكيك جدار الخلية النباتية (كما هو الحال لدى بعض الفطور الممرضة للنبات) فهي تعتمد على إنتاج وإفراز إنزيمات تحلل مكونات الجدر الخلوية النباتية CWDE (Agrios, 2005) حيث تقوم بدور هام في تأمين حاجة البكتيريا من نواتج التحلل كما تسمح للبكتيريا بالانتشار إلى ما بعد مواقع العدوى نتيجةً لتحلل الصفائح الوسطى التي تربط الخلايا النباتية معاً (Kunkel and Chen, 2006) وفي مثابرتها (استمرارها) لفترات طويلة بعيدةً عن عوائلها في الأنسجة الميتة أو في التربة (Walton, 1994) وفيما يلي قائمة للإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية المفرزة من العوامل الممرضة للنبات بشكل عام (جدول 2).

جدول2: قائمة بالإنزيمات المحللة لمكونات الجدر الخلوية

Cellulase (endo β-1,4-glucanase)
Cellulase (cellobiohydrolase)
Cellulase (β-glucosidase)
Pectinase(endopolygalacturonate lyase)Endo PL
Pectinase(exopolygalacturonate lyase)Exo PL
Pectinase(endopolygalacturonase)Endo PG
Pectinase(exopolygalacturonase) Exo PG
Pectinase(pectin methyl esterase)PME
β-1,4-xylanase
β−Xylosidase
α-glucosidase
β-1,3-glucanase(laminarinase)
β-1,3-1,4-glucanase(mixed-linked glucanase)
α-galactosidase
β-galactosidase
β-1,4-galactonase
Protease
Phospholipase

Source:(Walton.1994)

إن معظم CWDE خارجية الإفراز وتنتجها الخلية البكتيرية إما بشكل مستمر (Constitutive) أو بتحريض من عوائلها النباتية (Induced)، ولا يعد وجود هذه الإنزيمات أو كميتها مقياساً دائماً لقدرة البكتيريا على إحداث المرض (Cantu *et al.,* 2008) إلا أنها تعتبر أهم عوامل الشراسة التي تفرزها البكتيريا الممرضة للنبات إلى الوسط الخارجي سواءً كانت Biotrophes أو Necrotrophes (Cantu *et al.,* 2008)، وتختلف المورثات التي ترمز CWDE بشكل كبير باختلاف العوامل الممرضة بالرغم من أنها تفرز بمعظمها من خلال T II -SS كما يوضح الجدول3 (Jha *et al.,* 2005).

وتعتبر إنزيمات البكتيناز والسيللولاز أهم الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية التي تفرزها البكتيريا الممرضة للنبات بشكل خاص والعوامل الممرضة للنبات عموماً، لأنها تساهم في تفكيك أهم مكونات الجدر الخلوية للنبات (Wood, 1960; Daniels *et al.,* 1988)، وقد أثبتت دراسات موسعة دور CWDE في القدرة الإمراضية للبكتيريا المسببة لأمراض العفن الطري Soft-Rot مثل *E. chrysanthemi* و *E. carotovora* (Toth *et al.,* 2003) وبكتيريا *Xcc* المسببة لمرض العفن الأسود Black rot على نباتات العائلة الصليبية (Da Silva *et al.,* 2002) وبالمقابل يعتبر دور CWDE أقل أهمية في تطور أعراض الإصابة بالذبول الوعائي والتبقعات الناتجة عن الإصابة ببعض الأنواع البكتيرية مثل *P. syringae* و *R. solanacearum* إلا أنها تساهم في عملية اجتياح الأوعية الناقلة والانتشار ضمنها (وخاصة البكتيناز والسيللولاز) (Huang and Allen, 2000) كما تبين وجود ارتباط واضح بين إفراز CWDE من جهة وقابلية الأنسجة النباتية للإصابة وتطور الأعراض وزيادة الشراسة من جهة أخرى لكثيرٍ من الأنواع البكتيرية الممرضة للنبات (جدول3) وذلك باستخدام طريقة التطفير بواسطة الدنا DNA-mediated-mutation التي تعتمد على تكوين سلالات طافرة خاصة غير قادرة على إفراز أحد الإنزيمات واختبار قدرتها الإمراضية على النبات ثم مقارنتها مع السلالة الأصلية (Walton, 1994).

جدول 3: الإنزيمات المفرزة عبر نظام الإفراز الثاني عند بعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات.

Name Of The Bacterium	**Known Effectors**
Erwinia carotovora ssp.*carotovora*	Pectate Lyases **Cellulase/Endoglucanase/** Polygalacturonase
Erwinia carotovora ssp.*atroseptica*	Pectate Lyases **Cellulase/Endoglucanase/** Putative Exported Plant-Proteoglycan Hydrolase
E.chrysanthemi	Pectate Lyases Polygalacturonase Pectin Methyl Esterases Pectin Acetylesterases **Cellulase/Endoglucanase/** Rhamnogalacturonate Lyase FaeD Esterase
Ralstonia solanacearum	Polygalacturonase Pectin Methyl Esterases **Cellulase/Endoglucanase/** **Exo-Cellobiohydrolase**
Xanthomonas campestris pv.*campestris*	**Cellulase/Endoglucanase/** Polygalacturonate Lyases Proteases A-Amylase
X .oryzae pv.*oryzae*	Xylanase **Cellulase/Endoglucanase/** Putative Cysteine Protease Lipase/Esterase

Source: (Jha *et al*.2005)

جدول 4:الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية التي تم اختبار دورها في القدرة الإمراضية بطريقة DNA-mediated mutation.

Enzyme	**Bacteria**
Endo PG	*Erwinia-Agrobacterium-Pseudomonas*
Exo PG	*Erwinia*
PL	*Erwinia- Pseudomonas*
PME	*Erwinia*
Protease	*Erwinia-Xanthomonas*
Cellulase	*Xanthomonas-Pseudomonas*

Source: (Walton.1994)

1-2-8-1- الإنزيمات المحللة للبكتين Pectinolytic Enzymes:

البكتين بوليمر خطي يتألف بشكل أساسي من جزيئات D-galacturonic acid متتالية مرتبطة معاً بروابط α- 1,4 glycosidic linkages (Agrios, 2005) ويشكل نسبة 0.5 – 4% من الوزن الرطب للأنسجة النباتية حيث يتركز في الصفائح الوسطى التي تربط الجدر الخلوية معاً (Kashyap *et al.,* 2001) ويتواجد في المملكة النباتية بعدة أشكال بنيوية ولهذا السبب تنتج العوامل الممرضة للنبات أنماط مختلفة من الإنزيمات المحللة للبكتين أثناء هجومها على الأنسجة النباتية (Jayani *et al.,* 2005)، حيث تفرز كل من *Ech* و*Ecc* أنماط مختلفة ومتعددة من الإنزيمات المحللة للبكتين (جدول5) حيث تقوم بدور هام في القدرة الإمراضية لهذه البكتيريا وغيرها من مسببات العفن الطري (Barras *et al*., 1994) كما تفرز بكتيريا *R. solanacearum* إنزيم Endopolygalacturonase الذي يساهم في شراسة هذه البكتيريا إلا أنه ليس ضرورياً من أجل قدرتها الإمراضية، بينما تفرز بكتيريا *Xcc* ثلاثة أنماط من إنزيمات Pectate lyase لكن لم يتضح دورها في قدرتها الإمراضية (Daniels *et al.,* 1988) كما تساهم إنزيمات Pel في شراسة بكتيريا *P. viridiflava* (Jakob, 2007).

جدول ٥: الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية التي تفرزها بكتيريا العفن الطري من الجنس *Erwinia*.

Bacterial species	Name	Activity	Secretion Pathway	Substrate	Products	pH opt
E.chrysanthemi	PelA	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	Predominant Oligomers (Di- dodecamers)	8.6
	PelB	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	Predominant Oligomers (tri-tetramers)	8.9-9.5
	PelC	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	Predominant Oligomers (tri-tetramers)	8.9-9.5
	PelD	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	not defined	9
	PelE	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	Dimers	9
	ExoPeh	exo-polygalacturonase	Out	Polygalacturonate	Dimers	
	CelY	Cellulase	?	CMC		5.5
	CelZ	Cellulase	Out	CMC	Cellobiose	6.2-7.5
	Pem	Pectin methylesterase	Out	Pectin	Pectate	5--9
	PrtA	Protease	prt	Gelatin Azocasein		
	PrtB	Protease	prt	Gelatin Azocasein		
	PrtC	Protease	prt	Gelatin Azocasein		
	PrtG	Protease	prt	Gelatin Azocasein		
	PlcA	Phospholipase	?	Lecithin	Phosphatidyl Choline	
E.carotovora	PelA	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	Predominant Oligomers (Di- dodecamers)	8.5
	PelB	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	Predominant Oligomers (tri-tetramers)	8.3
	PelC	endo-Pectate Lyase	Out	Polygalacturonate	Predominant Oligomers (tri-tetramers)	
	Peh	polygalacturonase	Out	Polygalacturonate	Dimers	5.5
	CelS	Cellulase	Out	CMC	Cellobiose	6.8
	CelV	Cellulase	Out	CMC, MUC	Cellobiose	7
	Prt1	Protease	?	Gelatin		
	Pnl	Pectin Lyase	?	Pectin		

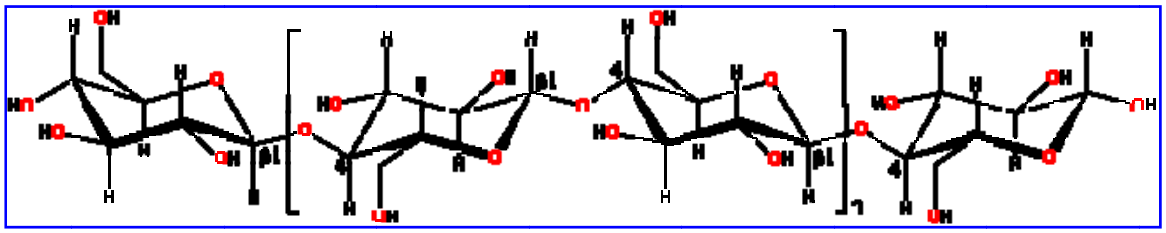
? The Location was not Clearly Established

CMC: Carboxy Methyl Cellulase, MUC: Methyl Umbelliferyl Cellobioside, Out: Type two secretion system, prt: type one secretion system

source: (Barras *et al*., 1994)

1-2-8-2- الإنزيمات المحللة للسلولوز Cellulolytic Enzymes:

السلولوز بوليمر خطي مكثف يتألف من جزيئات D-glucopyranase التي ترتبط معاً بروابط β-1,4-glucosidic linkages (شكل 1) بدرجة بلمرة 100 – 20000 (Zhang and Lynd, 2004) وترتبط السلاسل المتجاورة بروابط هيدوجينية وقوى فاندرفالس مما يعطي السلولوز بنيته الكريستالية ويزيد مقاومة الألياف تجاه التحلل وقوى الشد وهذا يمنح جزيئة السلولوز ثباتية عالية، إذ يبلغ نصف عمرها 5 – 8 مليون سنة (حتى تتحطم الروابط β-glucosidic) بدرجة حرارة 25°س (Wolfenden and Snider, 2001).



شكل 1: البنية الأساسية لجزيئة السلولوز والروابط (β- 1,4- glucosidic linkages)

يتواجد السلولوز في الطبيعة بشكلين متمايزين هما I_α و I_β ، حيث يسود النوع I_α في سلولوز البكتيريا *Acetobacter* وسلولوز الطحالب *Valonia* بينما يوجد النوع I_β في النباتات الراقية (Zhang *et al.*, 2006) حيث تعتبر ألياف السلولوز الدقيقة الوحدات البنيوية الأساسية لجدار الخلية عند جميع النباتات الراقية، وتتراوح نسبة السلولوز من 12 % في الأنسجة غير الخشبية والأعشاب إلى 50 % في الأنسجة الخشبية الناضجة، وتصل حتى 90 % في ألياف القطن (Agrios, 2005).

ويتم تحلل كريستالات السلولوز (السلولوز غير المنحل) بشكل كامل إلى غلوكوز عند اجتماع ثلاث إنزيمات محللة للسلولوز موضحة في الجدول (6).

جدول 6: الإنزيمات اللازمة لتفكيك السلولوز إلى غلوكوز.

Enzyme Commission number	Isoenzyme	
EC3.2.1.4	β-1,4-Endoglucanase (CMCase)	**1**
EC3.2.1.91	Exoglucanase (EXG)	**2**
EC3.2.1.21	β-D-Glucosidase (BGase)	**3**

Source: (Rabinovich *et al.,* 2002)

حيث يفكك CMCase في البداية الروابط الغلوكوزيدية المتاحة ما بين الجزيئات بشكل عشوائي ليعطي سلاسل (بوليمرات) بنهايات جديدة (مختلفة)، عندها يتقدم EXG ليحطم الروابط الغلوكوزيدية الطرفية فيؤدي لخفض درجة بلمرة السلاسل ويعطي سللوبيوز Cellubiose منحل والغلوكوز أحياناً وأخيراً يحول إنزيم BGase السللوبيوز إلى غلوكوز (Zhang *et al.,* 2006).

ولقد تمت دراسة الإنزيمات المحللة للسلولوز بشكل كبير في الأنواع البكتيرية التي تتبع الأجناس: *Clostridium*، *Cellulomonas*، *Bacillus*، *Bacteriodes*، *Ruminococcus*، *Thermomonospora*، *Acetovibrio*، *Microbispora* حيث ينتج العديد منها الإنزيمات المحللة للسلولوز بفعالية متخصصة مرتفعة وبشكل خاص لدى البكتيريا اللاهوائية منها مثل *Bacteriodes* و *Clostridium thermocellum* (Cheng and Sun, 2002) وذلك لأهمية إنزيمات السيللولاز في المجالات الصناعية والغذائية وبشكل خاص في إنتاج الإيثانول الحيوي (Wilson, 2009)، إلا أن معظم الأنواع البكتيرية غير قادرة على تحليل السلولوز الكريستالي (المتبلور) لأنها تنتج CMCase فقط بدون EXG (Robson and Chambliss, 1989) وبالمقابل كان الاهتمام أقل بدراسة دور إنزيمات السيللولاز في أمراض النبات بالرغم من أن الكثير من البكتيريا الممرضة للنبات تنتج إنزيمات CMCase مثل:

−P. fluorescens −P. solanacearum −Pseudomonas panici

− X. nigromaculans −X. citri − Xanthomonas campestris pv. *campestris*

E.carotovora −Erwinia milletiae −X. vesicatoria −X. pruni −X. pisi −X. oryzae

−E.carotovora subsp. *atroseptica* −subsp. *carotovora*

−*Streptomyces scsbies* −*E. chrysanthemi*

−*Bacillus* spp. −*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Masao and) −*Xylella fastidiosa* −*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

.(Norio, 1958; Priest, 1977; Janes, 2005

كما أثبت Hildebrand و Schroth (1964) قدرة العديد من أنواع البكتيريا الممرضة للنبات على إفراز الإنزيم BGase ومنها: *P. syringae*، *P. fluorescens*، *X. vesicatoria*، *X. pruni*، *X. corylina*، *E. carotovora*، *E. chrysanthemi*، *E. amylovora*، *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*، حيث تساهم هذه الإنزيمات في شراسة البكتيريا وحدّة الأعراض التي تحدثها على الأنسجة النباتية وبشكل خاص لدى البكتيريا Necrotrophes التي تقتل العائل (Cantu *et al.,* 2008)، ومنها بكتيريا العفن الطري التي تعتمد على إنتاج الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية بشكل أساسي في تحليل الأنسجة النباتية إلى مكوناتها البسيطة حتى تستفيد منها كمصادر للطاقة (Hélias *et al*., 2000). وتمتاز هذه البكتيريا بإنتاجها لعدد من نظائر CMCase والتي تؤدي من خلال أثرها التراكمي لتحلل السلولوز في الجدر الخلوية النباتية، حيث تنتج بكتيريا *Ech* اثنين من الأنماط الإنزيمية EGZ و EGY (Boyer *et al*., 1987) كما تنتج بكتيريا *Ecc* كل من CelV و CelS (Saarilahti *et al*., 1990) وقد أثبت Gough وزملاؤه (1988) إنتاج البكتيريا Xcc8004 لاثنين من الأنماط الإنزيمية لإنزيم CMCase والتي تشفرها المورثتان *ENGXcA* و *ENGXcB* بينما تنتج بكتيريا الجنس *Bacillus* عدد من الأنماط الإنزيمية حسب النوع تسمى CelA, B, C, F (Rabinovich *et al*., 2002).

وحتى الآن لا توجد دلائل واضحة على دور كل منها في القدرة الإمراضية إلا أنها تساهم مع الإنزيمات الأخرى في شراسة البكتيريا وحدة الإصابة، فقد أثبت Mäe وزملاؤه (1995) أن أي طفرة في المورثة *CelV* المسؤولة عن إنتاج النمط الإنزيمي CelV ستؤدي لخفض شراستها كما وجد أن حدوث طفرة في المورثات المنظمة لإنتاجه لدى بكتيريا *Ecc* سيؤدي لخفض شراستها أيضاً بالرغم من قدرتها على إفراز البكتيناز (Frederick *et al*., 1997).

كما بينت دراسات مشابهة على بكتيريا *Ech* انخفاض دور إنزيم CelZ في شراسة السلالة 3937 على البنفسج الإفريقي *Saintpaulia inonantha* مقارنةً مع CelY الذي يقوم بدوره في المراحل الأولى من

الإصابة حيث أبدت النباتات المصابة بالسلالة الطافرة (CelY⁻) تأخر بظهور المرض مقارنةً مع السلالة الأصلية (Boccara *et al*., 1994) وهذا ما دفع الباحثين إلى الافتراض أن مادة التفاعل التي يعمل عليها CelY متوفرة بكثرة في الصفائح الوسطى في الجدر الخلوية النباتية مما يجعل البكتين أكثر عرضة للتحلل بواسطة البكتيناز.

كذلك الأمر بالنسبة لأمراض التبقعات واللفحات حيث تقوم إنزيمات السيللولاز بدور هام في شراسة البكتيريا المسببة لها مثل *Xanthomonas* (Gough *et al*., 1988; Jha *et al*., 2005) فقد تم تعريف سلالة جديدة عالية الشراسة من *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* في السودان وخلال الدراسة تبين ارتباط شراسة البكتيريا مع إفرازها لمستويات عالية من Endoglucanase إضافةً لجزيئات قصيرة من LPS (huang *et al.,* 2008).

كما تبين أن لإنزيمات CMCase أهمية في تطور أمراض الذبول البكتيرية حيث تساهم في انتقال بكتيريا *R. solanacearum* ضمن الأوعية الخشبية الناقلة (Schell, 1987; Roberts *et al.,* 1988; Sail *et al*., 1997; Liu *et al*., 2005) كما انخفضت شراسة بكتيريا *Cms* على نباتات الباذنجان عندما فقدت البلاسميد الذي يحوي المورثات المسؤولة عن إنتاج CMCase (Metzler *et al*., 2000) كذلك تعتمد القدرة الإمراضية للبكتيريا *Cmm* NcppB382 على إنتاج CMCase حيث يقوم بتحليل الخشب في الجدر الخلوية للأوعية الناقلة وبالتالي إحداث أعراض الذبول على البندورة (Jahr *et al.,* 2000).

ولقد بينت الدراسات أن فعّالية الإنزيمات المحللة للسلولوز عند البكتيريا الممرضة للنبات تتأثر بمجموعة من العوامل مثل نمط الإنزيم المفرز Isoenzyme ومادة التفاعل ودرجة الحموضة وغيرها من ظروف الوسط الخارجي حيث أظهرت الدراسة التي قام بها Boyer وزملاؤه (1987) على السلالة 3665 من بكتيريا *Ech* أن CelZ مسؤول عن 97% من الفعالية الكلية للإنزيم بينما يمتلك CelY 3% من الفعالية الإنزيمية والتي تتركز في الفراغ البيربلاسمي (Reverchon *et al.,* 1994) كما أثبت Walker وزملاؤه (1994) أن CelV المسؤول عن 95% من الفعالية الإنزيمية لبكتيريا *Ecc* بينما يمثل CelS حوالي 5% من الفعالية الإنزيمية فقط، ووجد أن CelV يقوم بدور كبير في القدرة الإمراضية لهذه البكتيريا في إحداث العفن الطري على البطاطا، كما وجد أن ENGXcA المسؤول عن معظم الفعالية الإنزيمية المحللة للسلولوز لدى *Xcc* (Gough *et al*., 1990).

كما تتأثر الفعالية الإنزيمية بدرجة حموضة الوسط أيضاً فبعضها فعّال ضمن مجال واسع من الحموضة (2.2 – 9) كما هو الحال عند *Ecc* و *Ech* بينما كان المجال أقل قليلاً لدى بكتيريا Eca تراوح بين 3 و7 (El- Helaly *et al.,* 1979) بينما تتراوح درجة الحموضة المناسبة لإنتاج فعالية إنزيمية عالية من قبل أنواع الجنس *Bacillus* بين 5 و6 (Robson and Chambliss, 1989) والجدول (7) يبين درجة الحموضة المثالية لإنتاج CMCase لدى بعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات. كذلك أظهرت نفس الدراسة تأثر فعالية CMCase بالأملاح الموجودة في الوسط حيث حفزّ بعضها إنتاجه بفعالية مرتفعة بينما ثبطها البعض الآخر كما هو موضح في الجدول(8).

جدول 7: درجة الحموضة المثالية لإنتاج فعالية إنزيمية مرتفعة من CMCase من قبل بعض أنواع البكتيريا الممرضة للنبات.

Bacterial species	Optimal PH
E. chrysanthemi	6
X. campestris	5-6
X. oryzae	7
P. solanacearum	6
P. panici	5
C. michiganensis subsp. *sepedonicus*	5

Source: (Goto and Okabe, 1959)

حتى أن درجة الحرارة تؤثر على فعالية CMCase حيث تتراوح درجة الحرارة المثالية لفعالية CMCase لدى غالبية البكتيريا الممرضة للنبات بين 37 – 40°س (Goto and Okabe, 1959)، وبالمقابل يتميز CMCase الذي تنتجه بكتيريا *B. subtilis* بأنه ثابت بالحرارة حتى درجة 5±50°س حتى أن الحرارة المثالية لبعض الأنواع 60°س (Robson and Chambliss, 1989).

جدول 8: تأثير بعض المحاليل الملحية (بتركيز 1M) على فعالية الإنزيمات المحللة للسلولوز لدى بعض الأنواع البكتيرية الممرضة للنبات.

	NaCl	KCl	$MnCl_2$	$MgSo_4$	$CaCl_2$
P. solanacearum	0	+	-	-	0
P. panici	0	+	-	+	+
X. campestris	0	0	0	-	-
X. pisi	-	-	+	-	+
E. chrysanthemi	-	-	0	-	-
E. carotovora	0	-	+	-	+
يشير الرمز 0 إلى عدم وجود تأثير في الفعالية الإنزيمية					
يشير الرمز – إلى وجود تأثير مثبط للفعالية الإنزيمية					
يشير الرمز + إلى وجود تأثير محفز للفعالية الإنزيمية					

Source: (Goto and Okabe, 1959)

كذلك أظهرت الدراسات أن السلالة 3665 من بكتيريا *Ech* تفرز مستوى منخفض من إنزيم CMCase عند نمو البكتيريا في وسط لا يحوي السلولوز، كما وجد أن هناك علاقة عكسية مابين مستوى إنتاج CMCase ومعدل نمو المزرعة البكتيرية تحت ظروف محدودة من Glycerol أو Cellobiose وأن نمو المزرعة البكتيرية تحت شروط لاهوائية يجعلها تفرز مستوى عالٍ من CMCase كما كان إنتاجه مرتفعاً عند مستوى محدود من النتروجين (Boyer *et al.,* 1984).

1-3- مبررات البحث وأهدافه:

كُثفت الأبحاث في الفترة الأخيرة نحو دراسة دور الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية في القدرة الإمراضية للبكتيريا الممرضة للنبات ضمن إطار فهم آلية العدوى وطبيعة العامل الممرض بهدف تخفيض نسبة وشدة الأضرار التي تسببها، وكان للإنزيمات المحللة للبكتين النصيب الأكبر في هذه الدراسات والتي وَضّحت أهميتها في القدرة الإمراضية للكثير من الأنواع البكتيرية (Daniels *et al.,* 1988) وبالمقابل كانت المعلومات المتوفرة حول الإنزيمات المحللة للسلولوز ودورها في القدرة الإمراضية للبكتيريا الممرضة للنبات قليلة جداً ونادرة فيما يخص العزلات المحلية، كما كان جُل اهتمام الأبحاث المتعلقة بإنزيمات السيللولاز المفرزة من قبل البكتيريا الممرضة للنبات على النواحي التطبيقية لهذه الإنزيمات وبشكل خاص الأنواع التابعة للجنس *Erwinia*، بسبب قابليتها لاستخدامها في التحوير الوراثي (Wood *et al.*, 1997; Ingram *et al.*, 1999)، حيث أعطت إنزيمات السيللولاز البكتيرية بعد تنقيتها فعالية إنزيمية متخصصة تعادل تلك التي تنتجها الفطور بل وتتفوق عليها في بعض الأحيان (Robson and Chambliss, 1989)، بينما تناول القليل من الدراسات الدور الذي تقوم به إنزيمات السيللولاز في القدرة الإمراضية لبعض البكتيريا الممرضة للنبات والتي تسبب أضرار اقتصادية هامة وبخاصة أمراض العفن الطري واللفحات، لذا كان من المفيد الاهتمام بهذا الموضوع ودراسة العلاقة بين إفراز إنزيمات السيللولاز والقدرة الإمراضية لعزلات بكتيرية محلية تهدد الكثير من المحاصيل الإستراتيجية والثمار المخزونة في سورية وبخاصة التي تتبع كل من الأجناس *Erwinia*، *Xanthomonas*، *Bacillus*، حيث تم عزل الكثير من الأنواع التابعة لها ضمن سياق الأعمال البحثية التي تقوم بها كلية الزراعة.

بالتالي فقد هدفت هذه الدراسة إلى:

1. **تحديد العزلات البكتيرية الممرضة للنبات المحلية القادرة على إفراز إنزيمات السيللولاز.**
2. **دراسة تباين العزلات البكتيرية الممرضة للنبات في فعاليتها الإنزيمية.**
3. **تحديد دور إنزيمات السيللولاز في القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية.**

2- المواد والطرائق:

2-1- مكان تنفيذ البحث:

نُفذَّ هذا البحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية خلال الفترة 2009-2011.

2-2- العزلات البكتيرية:

اختبرت 51 عزلة بكتيرية محلية ممرضة للنبات تتبع 5 أجناس مختلفة: 15 عزلة من الجنس *Erwinia* و11 عزلة من الجنس *Bacillus* و12 عزلة من الجنس *Xanthomonas* و5 عزلات من الجنس *Pseudomonas* و8 عزلات من الجنس *Agrobacterium* تم الحصول عليها من مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة بجامعة دمشق، كما هو موضح في الجدول (9).

2-2-1- تجديد العزلات البكتيرية وإكثارها:

استخدم وسط KB (King's B) لتجديد العزلات البكتيرية وإكثارها، ويتألف هذا الوسط من المواد التالية:

- Proteose peptone (Difco No.3) 20.0 g
- K_2HPO_4 1.5 g
- $MgSO_4.7H_2O$ 1.5 g
- Agar 15.0 g
- Glycerol 10.0 g
- Distilled water 1.0 L

إلا أنه تم استخدام ببتون اللحم Peptone from meat بدلاً Proteose peptone حيث حُلّت المواد السابقة بكمية من الماء المقطر ضمن دورق مخروطي وأكمل الحجم إلى 1 لتر ثم ضبطت حموضة الوسط على 7 وعقم في الأوتوكلاف على درجة حرارة 121°س لمدة 20 دقيقة (King *et al.*, 1954).

جدول 9: العزلات البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة:

العزلة	الاسم العلمي	التصنيف	المرض
A24	*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*	Division:Gracilicutes Class: Proteobacteria Family :Enterobacteriacea	العفن الطري على البطاطا
144-2			
143-1			
143-2			
A10.1			
EchD	*Erwinia chrysanthemi*		
288-1			
288-2-1			
288-2-2			
288-2-3			
137-2	*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*		الساق السوداء على البطاطا
A130			
137-1			
310-1			
310-2-1			
O102-2-1	*Bacillus* spp.	Division: Firmicutes (gram-positive bacteria) Class: Firmibacteria	العفن الطري على البندورة وأوراق التبغ في المخازن
O102-2-2			
O103-2			
O104-1			
O104-2-1			
O104-2-2			
O125-2-1			
O125-2-2			
O127-2-2			
O131-2-1			
O95-1			
RG1-1	*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*	Division:Gracilicutes Class: Proteobacteria Family: Pseudomonadaceae	التبقع الزاوي على القطن
RG1-2			
RG2			
RG3-1			
RG6			
A79			
RG8-1	*Xanthomonas translucens*		التخطط البكتيري على النجيليات
RG8-2			
RG10-2			
RG11-1			
RG12-2			
RG14-3			
P75	*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*	Division:Gracilicutes Class: Proteobacteria Family: Pseudomonadaceae	سل الزيتون
P110			
P111			
P113			
P114			
AG10	*Agrobacterium tumefaciens*	Division:Gracilicutes Class: Proteobacteria Family: Rhizobiaceae	التدرن التاجي
AG19			
AG21			
AG25			
AG31			
AG32			
AG60			
AG61			

2-2-2- تحضير اللقاح البكتيري:

تمت تنمية البكتيريا في وسط KB السائل لتحضير اللقاح البكتيري من أجل اختبار الكشف عن إفراز الإنزيم بطريقة الهالة الشفافة بينما استخدم الوسط السائل CMC 1% من أجل اللقاح البكتيري المستخدم لاختبار الفعالية الإنزيمية، حيث حضنت البكتيريا على حرارة 27 °س لمدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة الدوارة (Rotary shaker) بسرعة 150 دورة / دقيقة.

وبالنسبة لاختبارات القدرة الإمراضية تم تحضير معلقات بكتيرية في ماء مقطر معقم من مزارع بكتيرية نقية وفتية بعمر 24 ساعة منماة على وسط KB بدرجة حرارة 27 °س.

2-2-3- قياس تركيز البكتيريا:

تم قياس تركيز البكتيريا في الوسط السائل أو في الماء المقطر المعقم من خلال قياس الامتصاصية بالمطياف الضوئي على طول موجة 600 نانومتر (OD_{600}=0.1) تقابل التركيز 10^8 وحدة مكونة لمستعمرة / مل (CFU/ml)) وتم تأكيد ذلك من خلال إجراء التخافيف والعد على الأطباق.

2-3- المادة النباتية:

- استخدمت درنات البطاطا من الصنف سبونتا لاختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا الجنس *Erwinia* والذي تم الحصول عليه من السوق المحلية. حيث غسلت الدرنات بالماء العادي لإزالة الأتربة ثم عقمت سطحياً بالكحول 75% وتركت لتجف، ثم قطعت إلى شرائح تراوح قطرها بين 4- 6 سم وكانت ثخانتها حوالي 1.5 سم وذلك قبل حقن المعلق البكتيري مباشرةً. وقد أجريت 5 مكررات (شرائح) لكل تركيز من كل عزلة.
- استخدمت بادرات قطن بعمر 10 أيام من صنف حلب 118 لاختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا النوع *Xcm* حيث زرعت البذور في أصص تحوي خلطة تتضمن تورب: تراب (1:2) بعد تعقيمها المسبق بالأوتوكلاف لمدة 20 دقيقة على حرارة 121°س. وضعت الأصص في صوانٍ بلاستيكية حيث أضيف إليها ماء الري وحضنت في غرفة النمو على حرارة 27 ± 2 °س وفق نظام 8 ساعات ظلام/16 ساعة إضاءة وضبطت الرطوبة على 70%.

- استخدمت ثمار البندورة من أحد الأصناف المحلية الذي تم الحصول عليه من أحد الحقول المزروعة بصنف واحد من البندورة، حيث غسلت أولاً بالماء العادي ثم عقمت سطحياً بالكحول 75% وتركت لتجف قبل إجراء العدوى.

2-4- الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية الممرضة للنبات على تحليل CMC (طريقة الهالة الشفافة):

2-4-1- وسط CMC:

استخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتيريا على إفراز الإنزيمات المحللة للسلولوز (Ariffin *et al.*, 2006) مع إجراء بعض التعديلات بإضافة الببتون ومستخلص الخميرة (جدول 10).

حيث ضبطت حموضة الوسط على pH 7 بعد اكتمال تجانسه ثم عقم في الأوتوكلاف على درجة حرارة 121 °س لمدة 20 دقيقة.

جدول 10: تركيب وسط CMC المعدل.

الكمية	وسط CMC الأساسي	التعديلات
10.0g	CMC	
1.0g	K_2HPO_4	
0.5g	$MgSO_4. 7H_2O$	
0.5g	NaCl	
0.01g	$FeSO_4. 7H_2O$	
0.01g	$MnSO_4. H_2O$	
0.3g	NH_4No_3	
3g		Peptone
3g		Yeast extract
15g	Agar	
1.0L	Distilled water	

Source:(Ariffin *et al.*, 2006)

2-4-2- اختبار الهالة الشفافة:

تم هذا الاختبار بإضافة 10 ميكرولتر من المعلق البكتيري المتجانس لكل عزلة على وسط CMC و بثلاث مكررات لكل عزلة، ثم حضنت الأطباق على حرارة 27 °س لمدة 72 ساعة، وفي نهاية فترة التحضين أخذت أقطار المستعمرات البكتيرية النامية على الأطباق، ثم غمرت الأطباق بمحلول مائي من أحمر الكونغو 1% لمدة 15 دقيقة، حيث تحول لون الوسط إلى الأحمر، ثم أضيف محلول ملحي NaCl (1M) وترك لمدة 15 دقيقة، ثم أخذ قياس قطر الهالة الشفافة. قُدِّرت كفاءة العزلات في تحليل CMC بحساب نسبة قطر الهالة الشفافة إلى قطر المستعمرة البكتيرية (Ariffin *et al.*, 2006)، إن ظهور هالة شفافة حول المستعمرات البكتيرية يشير إلى تحلل CMC في الوسط بسبب قدرة أحمر الكونغو على الارتباط مع البوليمرات السكرية المعقدة مثل CMC أو Xylan وليس مع السكريات البسيطة Oligosaccharides مشكلاً معقداً صعب الفك باستخدام المحلول الملحي (Teather and Wood, 1982).

2-5- تحديد الفعالية المتخصصة للإنزيمات المحللة للسلولوز:

2-5-1- تحضير الطافي (Supernatant) الحاوي على الإنزيم الخام:

- أضيف 50 ميكرولتر من اللقاح البكتيري إلى أنابيب اختبار فيها 5 مل من وسط CMC 1% السائل وبمعدل 12 أنبوب لكل عزلة (3 أنابيب لكل زمن) ثم حضنت على حرارة 27 °س في الحاضنة الهزازة الدوارة بسرعة 100 دورة / دقيقة.
- تم تثفيل الأنابيب على سرعة 7000 g لمدة 15 دقيقة وعلى حرارة 4 °س (Bakare *et al.*, 2005) وأخذ السائل الناتج عن تثفيل الأنابيب (الطافي) الحاوي على الإنزيمات المفرزة خارج الخلايا.

2-5-2- قياس تركيز البروتينات Protein Concentration:

يعتبر قياس البروتينات في الوسط ضرورياً لأنه مؤشر على إفراز الإنزيمات خارج الخلايا كما يستخدم لحساب الفعالية الإنزيمية المتخصصة، وقد تم ذلك حسب طريقة Bradford (1976) والتي يعتمد مبدؤها على تغير لون الكاشف (Comassie Brilliant Blue) من الأحمر (Amax 470nm) إلى الأزرق (Amax 595nm) عند ارتباطها مع البروتين.

2-5-2-1- المواد والكواشف الكيميائية المستخدمة:

- كاشف Bio-Rad: استخدم كاشف Bio-Rad X5 من شركة Rotch بالتخفيف الموصى به حيث أضيف 2 مل من الكاشف إلى 5 مل ماء معقم ثنائي التقطير وذلك قبل الاستخدام مباشرةً.
- محلول قياسي من Bovine Serum Albumin (BSA): حيث تم تحضير محلول قياسي من BSA بتركيز 100 ميكروغرام/مل في ماء معقم ثنائي التقطير وخفف للحصول على تراكيز متدرجة من BSA (جدول 11).

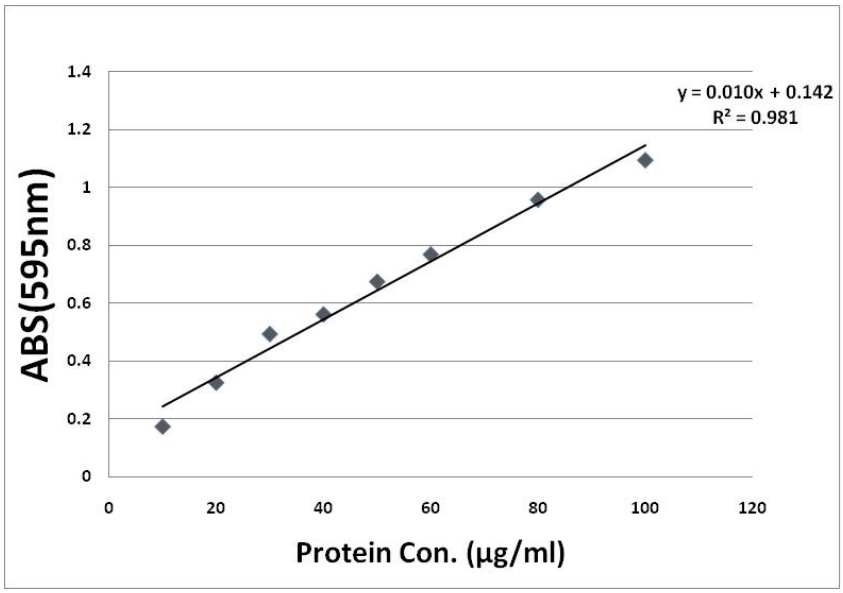
جدول 11: طريقة التخفيف والتراكيز النهائية لبروتين BSA حسب تعليمات الشركة الصانعة (Rotch):

حجم المحلول القياسي BSA(100µg/ml)	كمية الماء اللازمة للتخفيف (H_2Odd)	تركيز التخفيفات الناتجة BSA(µg/ml)
0µl	110 µl	0 µg/ml
40 µl	160 µl	20 µg/ml
45 µl	105 µl	30 µg/ml
80 µl	120 µl	40 µg/ml
60 µl	60 µl	50 µg/ml
120 µl	80 µl	60 µg/ml
160 µl	40 µl	80 µg/ml

2-5-2-2- مراحل قياس تركيز البروتينات:

- أخذ 50 ميكرولتر من السائل الناتج عن تثفيل البكتيريا (الطافي) ومحاليل BSA ذات التراكيز المتدرجة وبمعدل 3 مكررات لكل منها في كل زمن ووضعت في آبار أطباق إليزا ELISA (ذات 96 بئر).
- أضيف 200 ميكرولتر من كاشف Bio-Rad إلى كل عينة.
- تم تحضين أطباق العينات مع الكاشف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
- تم قياس الامتصاصية على طول موجة 595 نانو متر باستخدام جهاز قارئ إليزا (قارئ الأطباق الدقيقة) مقابل الشاهد الذي استبدلت فيه العينة أو BSA بمقدار 50 ميكرولتر ماء معقم ثنائي التقطير.

- رسم المنحني البياني للعلاقة بين تراكيز مختلفة من BSA والامتصاصية على طول موجة 595 نانو متر (شكل 2).
- استخدم المنحني القياسي لتحويل قيم امتصاصية العينات المختبرة إلى تركيز بروتين مقدراً بـ مغ/مل.



شكل 2: المنحني القياسي لتراكيز متدرجة من BSA مقابل الامتصاصية عند 595nm.

2-5-3- قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase:

نُفذ هذا الاختبار بالاعتماد على طريقة DNS حيث تحصل عملية أكسدة للوظيفة الألدهيدية للغلوكوز تترافق مع إرجاع DNS إلى 3-amino,5-nitrosalicylic acid أثناء حدوث التفاعل في الظروف القلوية:

(Oxidation) aldehyde group ----------> carboxyl group

(Reduction) 3,5-dinitrosalicylic acid ------> 3-amino,5-nitrosalicylic acid

وبالنتيجة يتشكل معقد لوني مع الغلوكوز يمكن تحديده على طول موجة 540 نانو متر(Miller, 1959)، وقد أجري الاختبار حسب Ghose (1987) مع تعديل درجة حرارة تحضين العينات إلى 40 °س بدلاً من 50 °س على النحو التالي:

2-5-3-1- المواد والكواشف الكيميائية المستخدمة:

- Citrate buffer (50mM, PH4,8): تم تحضيره بحل 10.5 g من Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7.H_2O$) في 750 مل ماء مقطر معقم وضبطت الحموضة على pH 4.8 من خلال إضافة NaOH على شكل حبيبات ومن ثم يكمل الحجم إلى لتر.
- كاشف DNS (Dinitrosalicylic Acid): تم تحضيره بحل المواد التالية في 700 مل ماء مقطر معقم ثم يكمل الحجم إلى 1000 مل:

- NaOH	10g
- Phenol	2g
- Na K Tartarate	182g
-DNS	10g
- Na_2So_4	0.5g

وحفظ الكاشف بدرجة حرارة 4 °س في عبوة زجاجية قاتمة اللون.

- ركيزة التفاعل (Substrate): تم تحضير محلول CMC 2% باستخدام Citrate buffer (0.05M, pH=4.8).
- غلوكوز: تركيز 2 مغ/ مل.

2-5-3-2- المنحني القياسي للغلوكوز:

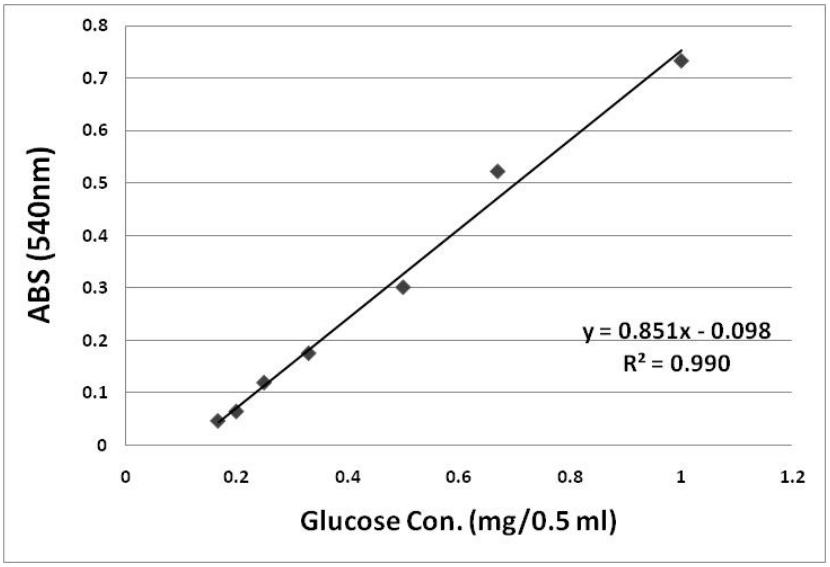
تم تحضير محلول قياسي من الغلوكوز (Anhydrous D- Glucose) بتركيز 2 مغ/مل باستخدام Citrate buffer حسب Ghose (1987)، ثم جهزت عدة تمديدات منه كما هو موضح في الجدول (12)، حيث أخذ 0.5 مل من كل تخفيف في أنبوب اختبار ثم وضع في حمام مائي على حرارة 40°س لمدة 5 دقائق، ومن ثم أضيف لها 0.5 مل من Citrate buffer ثم حضنت مجدداً في حمام مائي على حرارة 40 °س لمدة 30 دقيقة، وعند نهاية التحضين أضيف 3 مل من كاشف DNS ثم نقلت الأنابيب إلى حمام مائي يغلي لمدة 5 دقائق ثم تم تبريدها في ماء بارد وأضيف لكل أنبوب 14 مل ماء مقطر معقم، وفي

النهاية تم قياس الامتصاصية على طول موجة 540 نانو متر مقابل الشاهد الذي استبدل فيه محلول الغلوكوز بمقدار 0.5 مل من Citrate buffer.

وأخيراً رسم الخط البياني للعلاقة بين تركيز الغلوكوز والامتصاص الضوئي على طول موجة 540 نانو متر (شكل 3).

جدول 12: طريقة التخفيف والتراكيز النهائية من الغلوكوز المستخدمة لرسم المنحني القياسي للغلوكوز:

تركيز الغلوكوز بعد التخفيف Glucose Con. (mg/0.5ml)	**تركيز الغلوكوز بعد التخفيف** Glucose Con. (mg/ml)	**معدل التخفيف** Dilution Ratio	Citrate buffer	**حجم المحلول القياسي** Standard Solution (2mg/ml)
1mg/0.5ml	2mg/ml		0	1 ml
0.67mg/0.5ml	1.33mg/ml	1:1.5	0.5 ml	1ml
0.5mg/0.5ml	1mg/ml	1:2	1ml	1ml
0.33mg/0.5ml	0.66mg/ml	1:3	2 ml	1ml
0.25mg/0.5ml	0.5mg/ml	1:4	3 ml	1ml
0.2mg/0.5ml	0.4mg/ml	1:5	4 ml	1ml
0.17mg/0.5ml	0.33mg/ml	1:6	5 ml	1ml



شكل 3: المنحني القياسي لتراكيز متدرجة من الغلوكوز مقابل الامتصاصية عند 540nm.

2-5-3-3- مراحل قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase:

- أخذ 0.5 مل من السائل الناتج عن تثفيل البكتيريا في أنبوب اختبار سعته 50 مل ووضعت في حمام مائي على حرارة 40°س لمدة 5 دقائق.
- أضيف 0.5 مل من ركيزة التفاعل CMC 2% والتي سبق أن وضعت في حمام مائي على حرارة 40°س لمدة 5 دقائق أيضاً.
- حضنت العينة مع ركيزة التفاعل على حرارة 40°س لمدة 30 دقيقة في حمام مائي هزاز 95 دورة / دقيقة.
- أضيف 3 مل من كاشف DNS لكل أنبوب في نهاية فترة التحضين.
- نقلت الأنابيب بعدها إلى حمام مائي يغلي لمدة 5 دقائق.
- ثم وضعت الأنابيب في ماء بارد وأضيف لكل منها 14 مل ماء مقطر معقم.
- تم قياس الامتصاصية على طول موجة 540 نانو متر مقابل الشاهد الذي استبدلت فيه العينة وركيزة التفاعل بمقدار 1 مل من Citrate buffer، كما تم قياس امتصاصية العينة لوحدها وركيزة التفاعل لوحدها حيث طبقت الخطوات السابقة على كل من العينات وشاهد العينة وشاهد ركيزة التفاعل إضافةً لمحاليل الغلوكوز ذات التراكيز المتدرجة كما يوضح الجدول (13).

جدول 13: مراحل قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase لكل من العينات والشاهد والمحلول القياسي للغلوكوز.

محلول الغلوكوز القياسي Glucose Standard Solution	**شاهد الركيزة** Substrate Blank	**شاهد العينة** Enzyme Blank	**شاهد الكاشف** Reagent Blank (control)	**العينة** Sampels
0.5ml Glucose standard	0.5ml CB	0.5 ml sampel	0.5ml CB*	0.5 ml sampel
0.5ml CB	0.5 ml CMC2%	0.5ml CB	0.5ml CB	0.5 ml CMC2%
Incubation(40°C, 30min)				
3ml DNS				
Boiling 5min				
14 ml dH_2O				
ABS 540nm				

*CB: Citrate buffer

وبعد قياس الامتصاص الضوئي تم حساب الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase كما يلي:

- استخدمت معادلة المنحني القياسي للغلوكوز (شكل3) لتحويل قيمة الامتصاص الضوئي للعينات بعد طرح قيمة امتصاصية كل من العينة لوحدها وركيزة التفاعل لوحدها إلى تركيز غلوكوز مقدراً بواحدة مغ/0.5 مل.
- حسبت الفعالية الإنزيمية النسبية لإنزيم CMCase بالمعادلة التالية:

$$\text{CMCase (IU/ml)} = \text{mg glucose released} \times 0.37$$

وتعرّف الوحدة الدولية للفعالية الإنزيمية (IU) على أنها مقدار الإنزيم الذي يحرر ميكرومول واحد من السكريات المختزلة (معبراً عنها بصورة غلوكوز) في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التفاعل (Ghose, 1987).

- حسبت الفعالية المتخصصة من خلال إيجاد ناتج قسمة الفعالية الإنزيمية النسبية على تركيز البروتين في نفس العينة (Ghose, 1987) حسب المعادلة التالية:

$$\text{Specific activity (IU/mg protein)} = \frac{\text{Relative activity (IU/ml)}}{\text{Protein Con. (mg/ml)}}$$

2-5-4- قياس الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase:

نفذ هذا الاختبار حسب طريقة Rajoka وMalik (1997) مع تنفيذ الاختبار على حرارة 40°س بدلاً من 50°س على النحو التالي:

2-5-4-1- الكواشف والمواد الكيميائية:

- Citrate buffer (0.05M, pH= 4.8).
- ركيزة التفاعل PNPG: يتم تحضير محلول 5 mM من Paranitrophenol glucopyronoside باستخدام ماء مقطر معقم.
- محلول قياسي PNP: تركيز 50 ميكروغرام/ مل
- Na_2Co_3 (1M, PH=10).

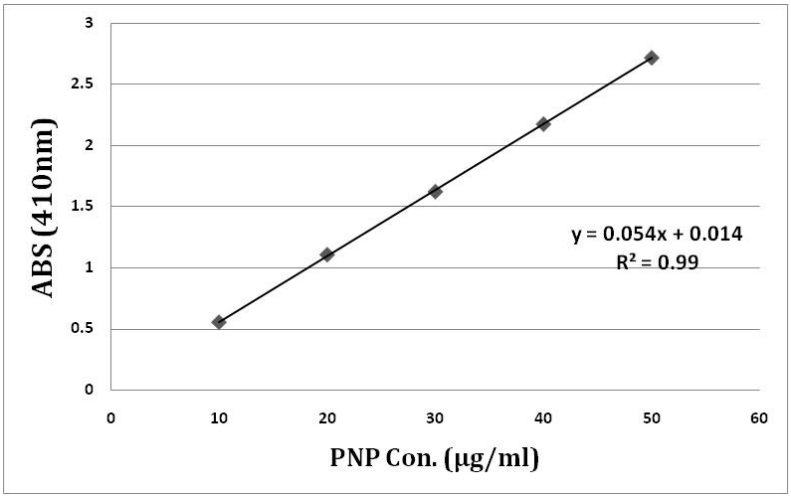
2-5-4-2- المنحني القياسي PNP:

حُضِّر محلول قياسي من Para-Nitrophenol بتركيز 50 ميكروغرام/مل ثم خفف للحصول على تراكيز متدرجة كما هو موضح في الجدول (14).

جدول 14 : طريقة التخفيف والتراكيز النهائية من PNP المستخدمة لرسم المنحني القياسي.

التركيز النهائي PNP Con. (µg/ml)	**حجم الماء المقطر المضاف** d water	**حجم المحلول القياسي** (50µg/ml) PNP (µl)
0	200	0
10	160	40
20	120	80
30	80	120
40	40	160
50	0	200

- أخذ 0.2 مل من كل تخفيف وأضيف له 0.4 مل من Citrate buffer و3 مل من Na_2Co_3 (1M, pH=10).
- تم قياس الامتصاصية على طول موجة 410 نانو متر مقابل الشاهد الذي استبدل فيه محلول PNP بنفس الحجم (0.2 مل) من Citrate buffer.
- رسم مخطط بياني يمثل العلاقة بين تراكيز مختلفة من PNP والامتصاصية على طول موجة 410 نانو متر (شكل 4).



شكل 4: المنحني القياسي لتراكيز متدرجة من PNP مقابل الامتصاصية عند 410nm.

2-5-4-3- مراحل قياس فعالية الإنزيم BGase:

- أخذ 0.2 مل من Citrate buffer في أنابيب اختبار وأضيف لها 0.2 مل من PNPG(5mM).
- أضيف 0.2 مل من رشاحة العينة التي سبق وأن وضعت في حمام مائي على حرارة 40°س لمدة 5 دقائق.
- تم تحضين الأنابيب في حمام مائي هزاز على حرارة 40°س لمدة 15 دقيقة وبسرعة 95 دورة/ دقيقة.
- في نهاية فترة التحضين أضيف 3 مل من Na_2Co_3 (1M, PH=10) لإيقاف التفاعل وحدوث التغير اللوني.
- أخذت الامتصاصية على طول موجة 410 نانو متر مقابل الشاهد الذي حُضر بإضافة 0.6 مل Citrate buffer إلى 3 مل من Na_2Co_3 (1M, PH=10)، كما تم قياس امتصاصية شاهد العينة وشاهد الركيزة كما هو موضح في الجدول (15).
- أجريت 3 مكررات (أنابيب) لكل عزلة عند كل زمن.

جدول 15: مراحل قياس فعالية الإنزيم BGase لكل من العينات والشاهد والمحلول القياسي.

العينة Samples	**شاهد الكاشف** Reagent Blank	**شاهد العينة** Enzyme Blank	**شاهد الركيزة** Substrate Blank
0.2 ml CB	0.2 ml CB	0.2 ml CB	0.2 ml CB
0.2 ml PNPG	0.2 ml CB	0.2 ml CB	0.2 ml PNPG
0.2ml Samples	0.2 ml CB	0.2ml Samples	0.2 ml CB
3ml Na_2Co_3			

وبعد قياس الامتصاصية تم حساب الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase:

تم تعويض قيم امتصاصية العينات (بعد طرح كل من شاهد العينة وشاهد الركيزة) في المعادلة التالية:

β- glucosidase (IU/ml)= ABS(410nm) × Standard Factor

Standard Factor = 18.65

حيث تعرّف وحدة الفعالية الإنزيمية الدولية من BGase بأنها مقدار الإنزيم اللازم لتحرير ميكرومول واحد من PNP في دقيقة واحدة.

ثم حسبت الفعالية المتخصصة من خلال إيجاد ناتج قسمة الفعالية الإنزيمية النسبية على تركيز البروتين في نفس العينة (Ghose, 1987) حسب المعادلة التالية:

$$\text{Specific activity (IU/mg protein)} = \frac{\text{Relative activity (IU/ml)}}{\text{Protein Con. (mg/ml)}}$$

2-5-5- قياس المحتوى الكلي من السكريات المختزلة Reducing sugar (RS):

يعتبر RS مؤشراً على تحلل CMC في الوسط إلى غلوكوز بفعل الإنزيمات المحللة للسلولوز التي أفرزتها البكتيريا إلى خارج الخلية حيث يتناسب تركيزها مع الفعالية الإنزيمية الكلية لإنزيمات السيللولاز (Otajevwo, 2011)، وقد تم تنفيذ الاختبار حسب Ghose (1987) كما يلي:

- أخذ 1 مل من السائل الناتج عن تثفيل البكتيريا في أنبوب اختبار وأضيف لها 3 مل من كاشف DNS ثم وضعت مباشرةً في حمام مائي يغلي لمدة 5 دقائق ثم نقلت بعد ذلك إلى ماء بارد وأضيف لها 14 مل ماء مقطر معقم.
- أخذت الامتصاصية على طول موجة 540 نانو متر مقابل الشاهد الذي استبدلت فيه العينة بماء مقطر معقم (1مل).
- أخذت 3 مكررات (أنابيب) لكل عزلة عند كل زمن.
- استخدم المنحني القياسي للغلوكوز المحسوب سابقاً لتحويل قيم الامتصاصية إلى تركيز غلوكوز في العينة مقدراً بـ مغ/مل.

2-6- دراسة العلاقة بين إفراز البكتريا للإنزيمات المحللة للسلولوز وقدرتها الإمراضية:

2-6-1- اختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا الجنس *Erwinia* على شرائح البطاطا:

نفذ الاختبار تبعاً لما ذكره Klement و Rudolph (1990) حيث استخدمت ثاقبة يدوية لإحداث حفر نظامية متماثلة قطرها 3 مم في وسط الشرائح بمعدل حفرة واحدة في منتصف كل شريحة قبل إضافة مادة اللقاح مباشرةً بمقدار 20 ميكرولتر وقد نفذت 5 مكررات لكل تركيز ومن كل عزلة، بينما استخدم الماء المقطر المعقم لمعاملة الشاهد السلبي.

وضعت الشرائح بعد إضافة المعلقات البكتيرية في أحواض بلاستيك أبعادها 35×20×10 سم تم تعقيم سطوحها الداخلية مسبقاً بالكحول 95% لمنع التلوث كما أضيف إليها حوالي 200 مل ماء مقطر معقم لتوفير الرطوبة المناسبة لحدوث العدوى على الشرائح التي وضعت على أطباق بتري داخل هذه الأحواض، ثم غطيت بورق ألمنيوم لتوفير جو محصور عالي الرطوبة داخل الأحواض وحضنت على حرارة 27°س.

أخذت القراءات بعد 24 ساعة من التحضين بقياس قطر منطقة التحلل على شرائح البطاطا حول مكان العدوى.

2-6-2- اختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا *X. campestris* pv. *malvacearum*:

أجريت العدوى بطريقة الارتشاح (النفاذ) داخل نسيج الورقة (Abdo-Hasan *et al.,* 2008) باستخدام محقن طبي بلاستيكي معقم، وذلك بين العروق الرئيسية على السطح السفلي للورقة، وحقن المعلق بلطف بحيث امتد تدريجياً في كامل نسيج الورقة الفلقية، حيث أجريت التجربة بخمس مكررات لكل عزلة واعتبر كل أصيص مكرراً. كما تم إجراء معاملة الشاهد باستخدام الماء المقطر المعقم فقط.

أعيدت الأصص إلى غرفة النمو بعد الحقن وتمت مراقبة النباتات يومياً لتحديد موعد بدء ظهور الأعراض وشدتها على مدى 10 أيام، كما تم قياس تراكيز البكتيريا ضمن النسيج النباتي بأخذ 1 سم² من نسيج الورقة الفلقية المصاب بعد إجراء العدوى على فترات زمنية متتالية 0، 24، 48، 120، 168 ساعة، حيث أخذت قطعة من الورقة الفلقية التي حقنت بالبكتيريا مساحتها 1 سم² ثم عقمت بالكحول 75% لمدة دقيقة ثم غسلت بماء مقطر معقم مرتين ثم طحنت في 1 مل ماء مقطر معقم وتركت لمدة 15 دقيقة ثم حسب تركيز البكتيريا في المعلق الناتج عن طريق إجراء تخافيف والعد على أطباق، تم تقييم القدرة الإمراضية لبكتيريا *Xcm* من خلال وصف الأعراض الظاهرية (البقع) التي أحدثتها ومعدل نموها وتطورها ضمن الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية مع الزمن (Huang *et al.*, 2008).

2-6-3- اختبار القدرة الإمراضية لبكتيريا الجنس *Bacillus*:

استخدم محقن طبي بلاستيكي معقم بسعة 1 مل لحقن 100 ميكرولتر من المعلق البكتيري تحت بشرة ثمرة البندورة وقد أجريت التجربة بـ 3 مكررات (ثمار) لكل تركيز من كل عزلة بينما حقن الشاهد بماء مقطر معقم، ثم وضعت الثمار بعد حقنها على أطباق بتري ضمن أحواض بلاستيكية أبعادها (35×20×10 سم) سبق تعقيمها بالكحول 95% كما أضيف حوالي 200 مل ماء مقطر معقم في أسفل الأحواض لتوفير رطوبة نسبية ملائمة ثم أغلقت بإحكام بورق ألمنيوم لتوفير ظروف لاهوائية نسبياً ثم حضنت على حرارة 27 °س وسجلت القراءات بعد 3 أيام عند بدء ظهور الأعراض حيث أخذت أقطار التحلل الذي أحدثته البكتيريا حول منطقة الحقن.

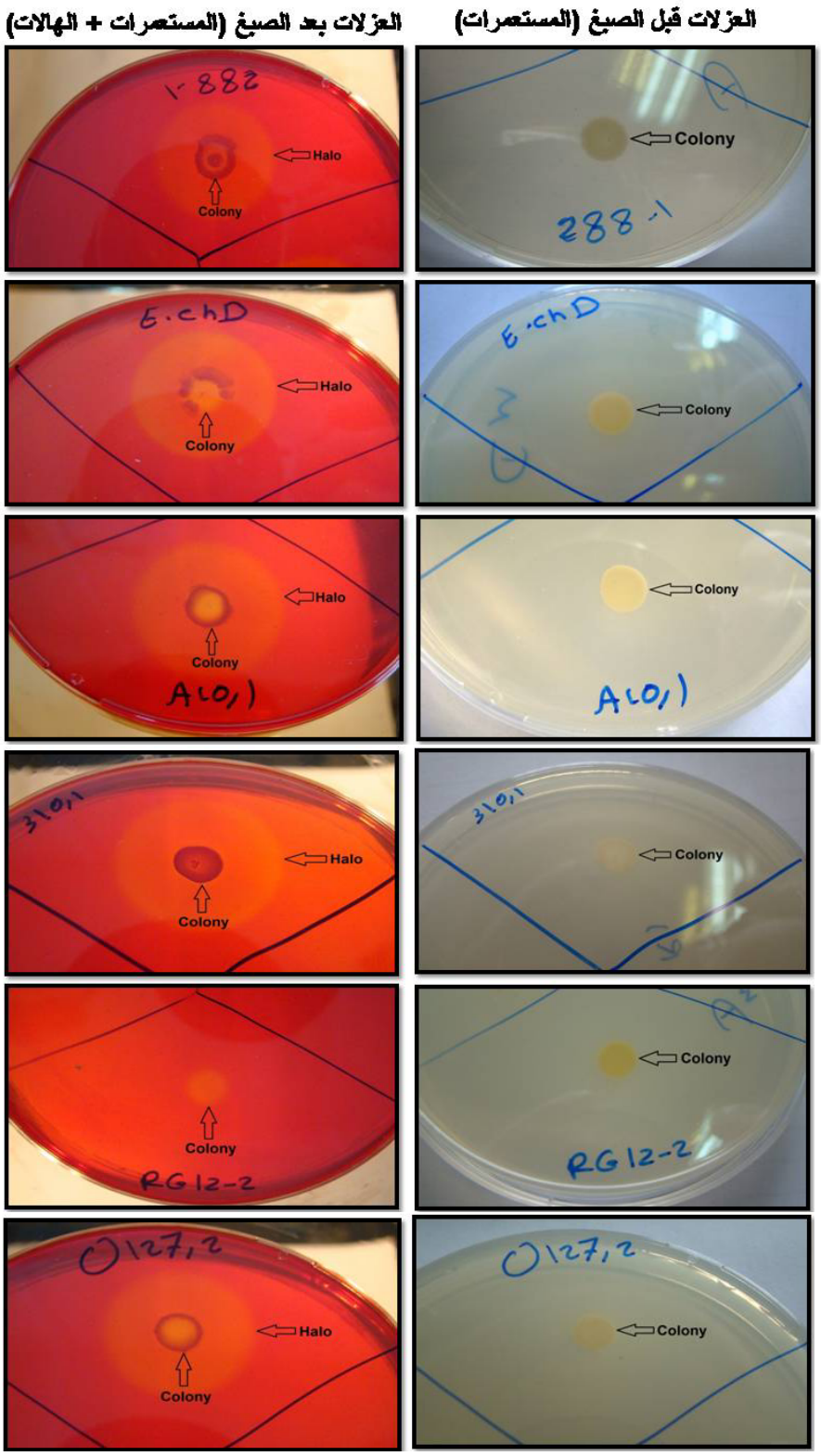
2-7- التحليل الإحصائي:

حللت البيانات بواسطة البرنامج الإحصائي SPSS.17 باختبار Tow-way ANOVA وبتصميم القطاعات العشوائية الكاملة وبوجود متغيرين حيث اعتمد كل من عاملي نوع البكتريا وتركيز المعلق كعاملين متحولين لتحديد الفروق المعنوية بين المعاملات على مستوى الدلالة الإحصائية 1% وحساب أقل فرق معنوي LSD. كما تم حساب معامل الارتباط لتحديد العلاقة بين القدرة الإمراضية وإفراز البكتريا للإنزيمات (ارتباط سبيرمان).

3- النتائج والمناقشة:

3-1-اختبار الهالة الشفافة للكشف عن قدرة عزلات بكتيرية محلية ممرضة للنبات على تحليل CMC في وسط الزرع:

أظهرت نتائج اختبار الهالة الشفافة قدرة جميع عزلات الجنسين *Erwinia* و*Bacillus* إضافةً لعزلات النوع *Xcm* على تحليل CMC في الوسط بينما أعطت عزلات كل من الأنواع *X. translucens*، *P. savastanoi* و*A. tumefaciens* نتيجة سلبية (شكل5). واعتماداً على قراءات نسبة قطر الهالة الشفافة إلى قطر المستعمرة والتي تعبّر عن كفاءة تحليل CMC في الوسط وجدت فروق معنوية على مستوى ثقة 99% بين هذه الأجناس حيث تفوق الجنس *Erwinia* بمتوسط كفاءة قدره 2.91، تلاه الجنس *Bacillus* بمتوسط كفاءة قدره 2.53، ثم الجنس *Xanthomonas* بمتوسط كفاءة 0.91 (جدول16)، حيث تصنف معظم البكتيريا الممرضة للنبات التابعة لكل من الجنسين *Erwinia* و*Bacillus* ضمن مسببات العفن الطري والتي تعتمد في قدرتها الإمراضية على إفراز مستويات عالية من الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية ومنها السيللولاز (Priest *et al.*, 1988; Toth *et al.*, 2003)، كما تفرز هذه الإنزيمات من بعض الأنواع البكتيرية المسببة لأمراض اللفحات مثل أنواع الجنس *Xanthomonas* (Alfano and Collmer, 1996)، بينما تعتمد الأنواع البكتيرية المسببة لأمراض التدرنات مثل *Agrobacterium tumefaciens* و*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* على إنتاج الهرمونات النباتية (مثل حمض الإندول الخلي) أو تحريض إنتاجها للتطفل على النبات والحصول على مصادر غذائها دون الحاجة إلى قتل وتحليل خلايا النبات (Comai *et al.*, 1982; Nester, 2000).



شكل 5: اختبار الهالة الشفافة للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على تحليل CMC (اليمين: المستعمرات قبل الصبغ، اليسار: المستعمرات والهالات بعد الصبغ).

لقد تباينت الأنواع البكتيرية ضمن الجنس الواحد في كفاءتها لتحليل CMC في الوسط. ففي الجنس *Erwinia* تفوق تحت النوع *Ecc* بمتوسط كفاءة 3.3 مقارنة مع تحت الأنواع *Eca* و *Ech* وبفروق معنوية بينما لم تكن هناك فروق معنوية بين تحت النوعين *Eca* و *Ech*.

جدول 16: كفاءة الأجناس البكتيرية المختبرة في تحليل CMC.

الجنس	كفاءة تحليل CMC
Erwinia	2.91 ± 0.58(a)
Bacillus	2.52 ± 0.6(b)
Xanthomonas	0.91 ± 1.15(c)
Agrobacterium	0(d)
Pseudomonas	0(d)
Control	0(d)

***الأرقام المشتركة بنفس الأحرف ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%**

وعند المقارنة بين العزلات المختبرة في كفاءتها لتحليل CMC وُجد أن العزلة A10.1 من تحت النوع *Ecc* كانت أعلى كفاءةً في تحليل CMC في الوسط وكانت قيمتها 3.85 بينما سجلت أقل كفاءة لدى العزلة 3-2-288 من النوع *Ech* وكانت 1.92. وقد تباينت عزلات كل نوع / تحت نوع على حدا حيث تراوحت كفاءة عزلات تحت النوع *Ecc* بين 3.85 لدى العزلة A10.1 و 2.79 لدى العزلة 1-143، كما تباينت كفاءة عزلات النوع *Ech* حيث كانت أعلى قيمة 3.21 لدى 1-288 وأدنى قيمة 1.92 عند 3-2-288. وفي عزلات تحت النوع *Eca* كانت أعلى قيمة 3.71 لدى العزلة 1-310 وأقل قيمة 1.99 عند 1-2-310 (جدول 17)، حيث أنه وبالرغم من اعتماد بكتيريا الجنس *Erwinia* المسببة للعفن الطري على إنتاج CWDE في قدرتها الإمراضية إلا أنها تتباين في إنتاج هذه الإنزيمات (Toth *et al.*, 2003) ويعود ذلك إلى اختلاف المورثات المسؤولة عن إنتاج إنزيم السيللولاز باختلاف العوامل الممرضة (Nunn, 1999) كما تبين وجود أكثر من نمط إنزيمي Isoenzyme لإنزيم CMCase المفرز من بكتيريا الجنس *Erwinia*

حيث تفرز بكتيريا *Ecc* النمطين CelV و CelS (Saarilahti *et al.*, 1990) بينما تفرز بكتيريا *Ech* النمطين CelZ و CelY (Reverchon *et al.*, 1994).

جدول 17: كفاءة عزلات الجنس *Erwinia* في تحليل CMC.

النوع	العزلة	الكفاءة التحليل	المعنوية
Eca	310-1	3.71 ± 0.5	ab
	A130	2.86 ± 0.27	cdef
	137-2	2.74 ± 0.18	ef
	137-1	2.52 ± 0.01	f
	310-2-1	1.99 ± 0.12	g
	mean	2.76 ± 0.62	**
Ecc	A10.1	3.85 ± 0.24	a
	144-2	3.67 ± 00	ab
	143-2	3.29 ± 00	bc
	A24	2.9 ± 0.11	cdef
	143-1	2.79 ± 0.18	def
	mean	3.3 ± 0.44	*
Ech	288-1	3.21 ± 0.07	cd
	EchD	3.08 ± 0.07	cde
	288-2-2	2.68 ± 0.09	ef
	288-2-1	2.44 ± 0.22	f
	288-2-3	1.92 ± 0.06	g
	mean	2.67 ± 0.49	**
Control	Control	0	***, h
LSD% بين الأنواع	0.32		
LSD% بين العزلات	0.42		

الأرقام التي تحمل أحرفاً مشتركة(a، b،..) أو رموز مشتركة(*،) لا توجد بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%**

كما كانت نتائج اختبار الهالة الشفافة على بكتيريا الجنس *Bacillus* المعزولة من ثمار بندورة مصابة بالعفن الطري إيجابية في جميع العزلات، حيث كانت العزلة O127-2-2 الأفضل بفرق معنوي على مستوى ثقة 99% ومتوسط كفاءة قدره 3.24، بينما كانت العزلة O102-2-2 أقلها كفاءةً بمتوسط قدره 1.66 (جدول18)، وهذا يتوافق مع الدراسات العديدة التي أثبتت قدرة أنواع الجنس *Bacillus* على إفراز الإنزيمات المحللة للسلولوز (Priest, 1977)، حتى أنه يتم استخدام سلالات متنوعة من الجنس *Bacillus* بهدف الإنتاج التجاري لإنزيمات السيللولاز باستخدام المخلفات الزراعية (Kotchoni *et al.*, 2006; Ayub *et al.*, 2002).

جدول 18: كفاءة عزلات الجنس *Bacillus* في تحليل CMC.

النوع	العزلة	الكفاءة التحليل	المعنوية
***Bacillus* spp**	O127-2	3.24 ± 0.08	a
	O131-2-1	3.17 ± 0.04	ab
	O95-1	3.14 ± 0.00	ab
	O103-2	3.02 ± 0.09	bc
	O104-1	2.88 ± 0.18	c
	O125-2-1	2.61 ± 0.09	d
	O125-2-2	2.57 ± 0.01	d
	O102-2-1	1.94 ± 0.05	e
	O104-2-1	1.83 ± 0.05	ef
	O104-2-2	1.75 ± 0.05	f
	O102-2-2	1.66 ± 0.01	f
Control	Control	0	g
LSD1% بين العزلات	0.174		

الأرقام التي تحمل أحرفاً مشتركة لا توجد بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

وبالمقابل لم تبدِ جميع عزلات الجنس *Xanthomonas* القدرة على تحليل CMC في الوسط حيث لم تسجل أي عزلة من النوع *X. translucens* أي نتيجة إيجابية، وهذا يتفق مع الدراسات السابقة بأن بكتيريا هذا النوع لا تفرز إنزيمات السيللولاز (Sawczyc *et al.*, 1989; Schroter *et al.*, 2001).

بينما أظهرت عزلات النوع *Xcm* نتائج إيجابية وبفروق معنوية بين العزلات، حيث كان أفضلها العزلة RG3-1 بمتوسط كفاءة قدره 2.55 وكانت العزلة RG1-1 الأقل كفاءةً بمتوسط قدره 1.37 (جدول19) وهذا يتفق مع ما ذكره Verma و Singh (1971) بأن لسلالات النوع *Xcm* القدرة على تحليل CMC في وسط الاختبار.

جدول 19: كفاءة عزلات الجنس *Xanthomonas* في تحليل CMC.

النوع	العزلة	الكفاءة	المعنوية
Xcm	RG3-1	2.55 ± 0.06	a
	RG2	2.51 ± 0.19	a
	RG6	2.42 ± 0.21	a
	RG1-2	2.41 ± 0.11	a
	A79	2.35 ± 0.03	a
	RG1-1	1.36 ± 0.05	b
	mean	2.27 ± 0.43	*
Xt	RG 10-2	0	c
	RG 11-1	0	c
	RG 12-2	0	c
	RG 14-3	0	c
	RG 8-1	0	c
	RG 8-2	0	c
	mean	0	**
Control	Control	0	** , c
LSD1%بين الأنواع	0.158		
LSD1%بين العزلات	0.207		

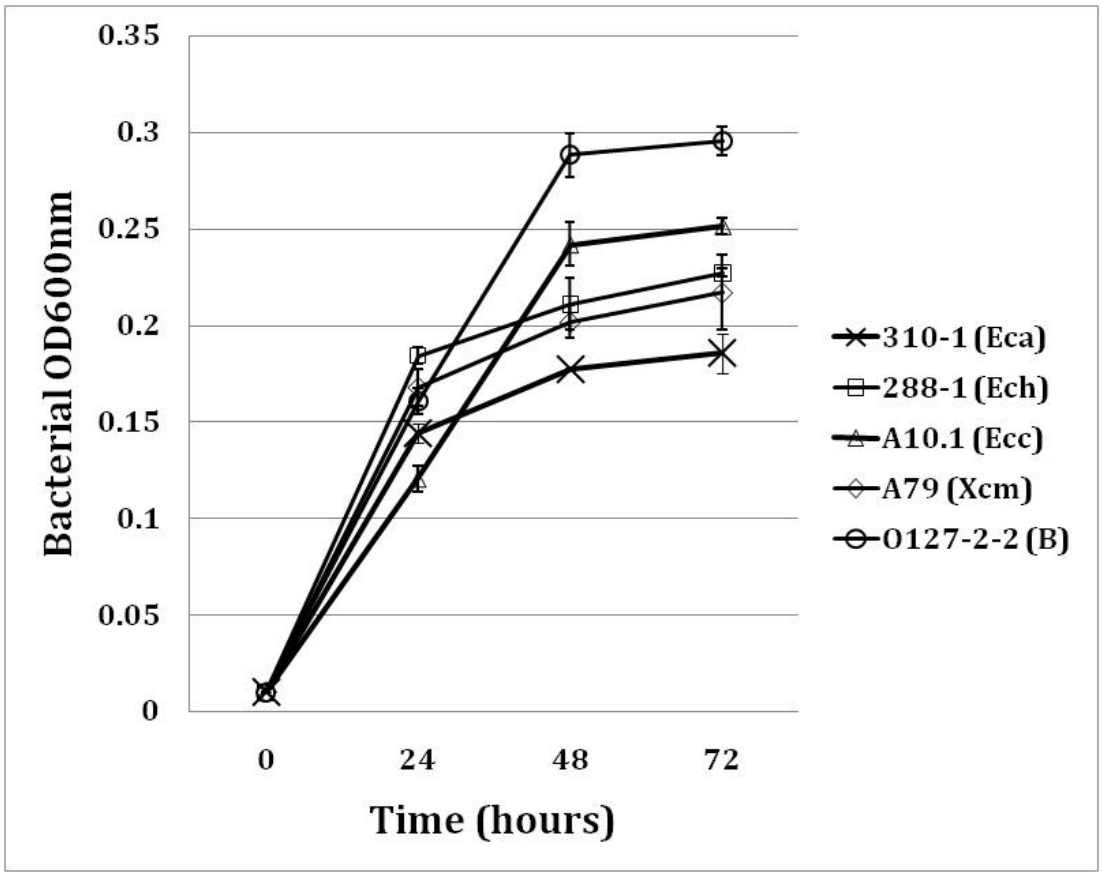
الأرقام التي تحمل أحرفاً مشتركة(a، b،..) أو رموز مشتركة(*،) ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%**

3-2- تقدير الفعالية المتخصصة للإنزيمات المحللة للسلولوز وتباينها حسب الأنواع البكتيرية:

نفذت الاختبارات على خمس عزلات بكتيرية: A10.1، 1-310، 1-288، 2-2-0127، A79، والتي تمثل الأنواع البكتيرية *Xcm, B, Ech, Eca, Ecc* على التوالي، والتي تفوقت في اختبار الهالة الشفافة على وسط CMC للمقارنة بين الأنواع وتحديد الزمن الأنسب لقياس الفعالية وذلك من خلال دراسة التغيرات التي طرأت على العزلات المزروعة (النامية) في وسط سائل يحوي CMC 1% كمصدر للكربون وعلى فترات زمنية متتالية (0، 24، 48، 72 ساعة) وتسجيل كل من: تركيز البكتيريا في الوسط (B con.)، المحتوى الكلي من السكريات المختزلة بشكل غلوكوز مكافئ (RS)، تركيز البروتينات في الرشاحة (P con.)، والفعالية الإنزيمية المتخصصة لكل من Endoglucanase:(CMCase) و β-glucosidase:(BGase) ، لكل عزلة كالتالي:

3-2-1- تحديد منحى نمو وتطور البكتيريا مع مرور الزمن:

تفوقت كل من العزلتين 2-2-0127 و A10.1 في معدل نمو كل منها وتطورها مع الزمن على بقية العزلات وبفروق معنوية على مستوى ثقة 99% (ملحق 1) ، بينما لم تكن الفروق معنوية بين العزلات الثلاث البقية، مع الأخذ بعين الاعتبار أنه تم ضبط تركيز اللقاح البكتيري لجميع العزلات عند الزمن صفر (بعد اللقاح مباشرة)، وقد استمر تركيز البكتيريا بالارتفاع عند جميع العزلات المختبرة حتى 48 ساعة، ومن ثم دخلت في طور الثبات حيث لم تكن هناك فروق معنوية بين متوسطات تراكيز البكتريا عند أخذ القراءات حتى 72 ساعة في كل عزلة (شكل6).

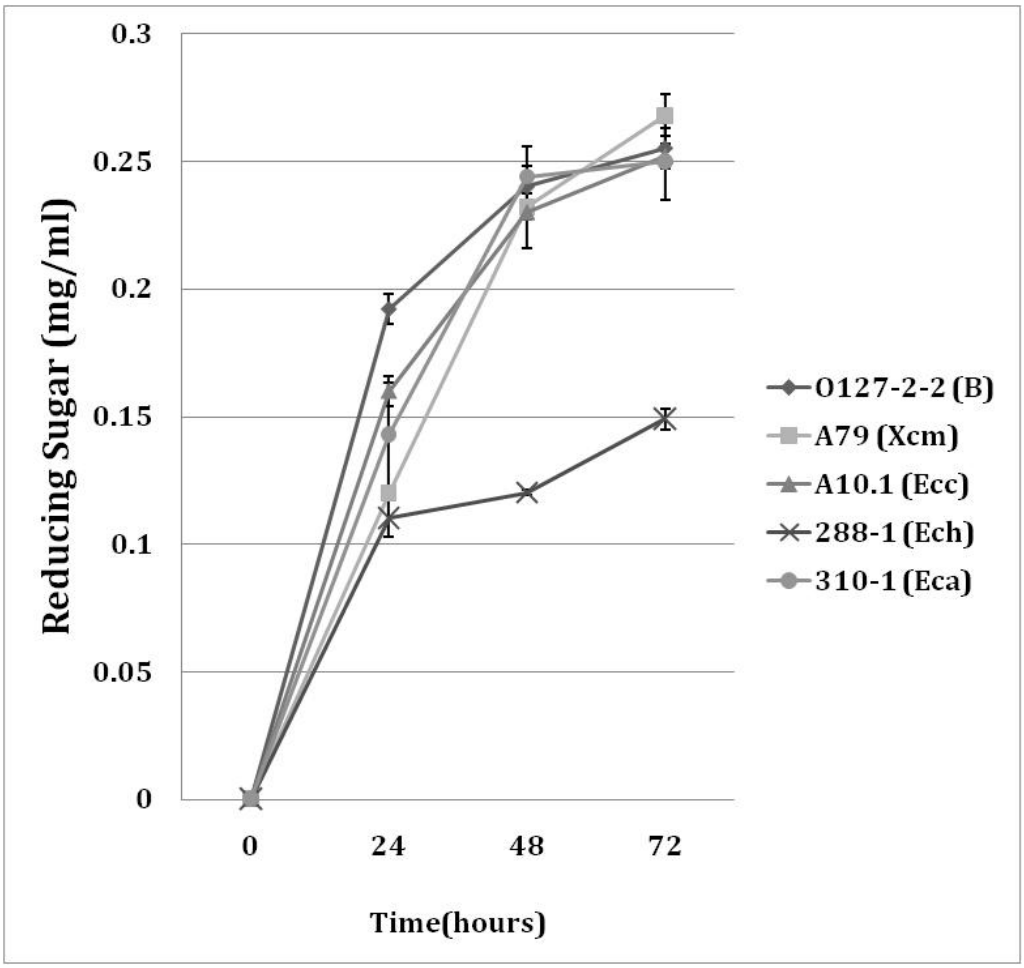


شكل 6: نمو وتطور البكتيريا المختبرة مع الزمن.

3-2-2- تقدير المحتوى الكلي من السكريات المختزلة:

لم يسجل وجود السكريات المختزلة في الطافي بعد اللقاح مباشرة عند كافة العزلات، ثم تزايدت الكمية مع مرور الزمن حتى أعطت جميع العزلات أعلى قيمة لتركيز RS بعد 48 ساعة (شكل 7) والتي تراوحت بين 0.12 لدى1-288 و 0.24 عند 1-310 وبفروق معنوية بين العزلات، وفي القراءة التالية بعد 72 ساعة لوحظت زيادة ظاهرية غير معنوية في تركيز RS عن القراءات المأخوذة بعد 48 ساعة لدى جميع العزلات باستثناء العزلة 2-2-0127 التي كانت مختلفة وأعطت أعلى قيمة بعد 72 ساعة وبفروق معنوية عن القراءة السابقة.

وقد تفوقت العزلة 2-2-0127 على باقي العزلات وبفروق معنوية في متوسط RS في الرشاحة خلال الأيام الثلاثة وجاءت العزلة 1-288 في المرتبة الأخيرة.

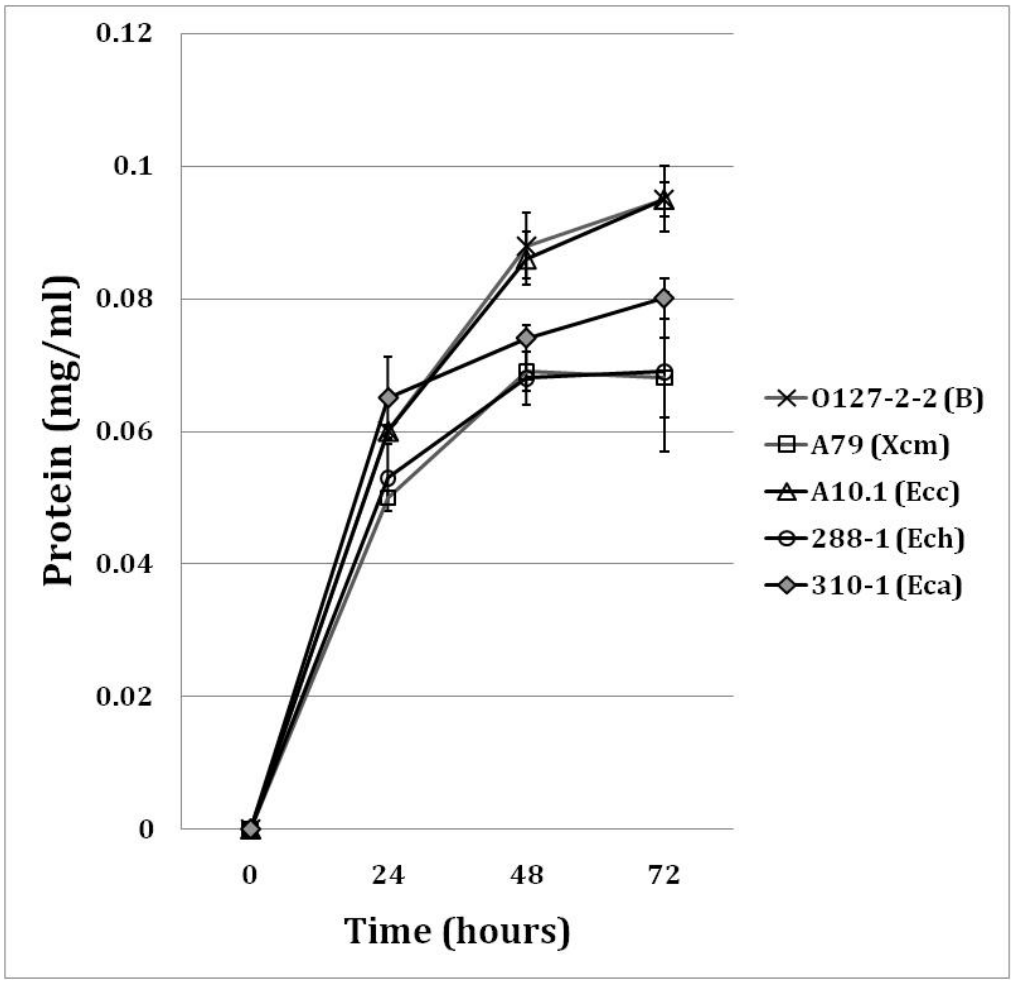


شكل 7: التغيرات الكمية في تراكيز RS مع الزمن للعزلات المختبرة.

3-2-3- تقدير تركيز البروتينات في السائل الناتج عن تثفيل البكتيريا:

لم تسجل أي قيمة لتركيز البروتين في الطافي عند الزمن صفر (بعد اللقاح مباشرة) بينما تراوحت قيمته مابين 0.05 عند العزلة A79 و 0.065 لدى 310-1 بعد 24 ساعة من التحضين وازداد التركيز في اليوم الثاني بفروق معنوية مقارنة مع اليوم الأول ومن ثم ارتفعت بشكل طفيف وغير معنوي في اليوم الثالث باستثناء العزلة A10.1 حيث كانت الفروق معنوية بين تركيز البروتين خلال الأيام الثلاثة على مستوى ثقة 99% (شكل8)، وقد تفوقت كل من العزلتين O127-2-2 و A10.1 على بقية العزلات وبفروق معنوية في

متوسط تركيز البروتين في الرشاحة خلال قراءات الأيام الثلاثة تلتهما العزلة 310-1 ثانياً، وكانت كل من العزلتين 288-1 و A79 الأقل في كمية البروتينات المقاسة (ملحق 3).



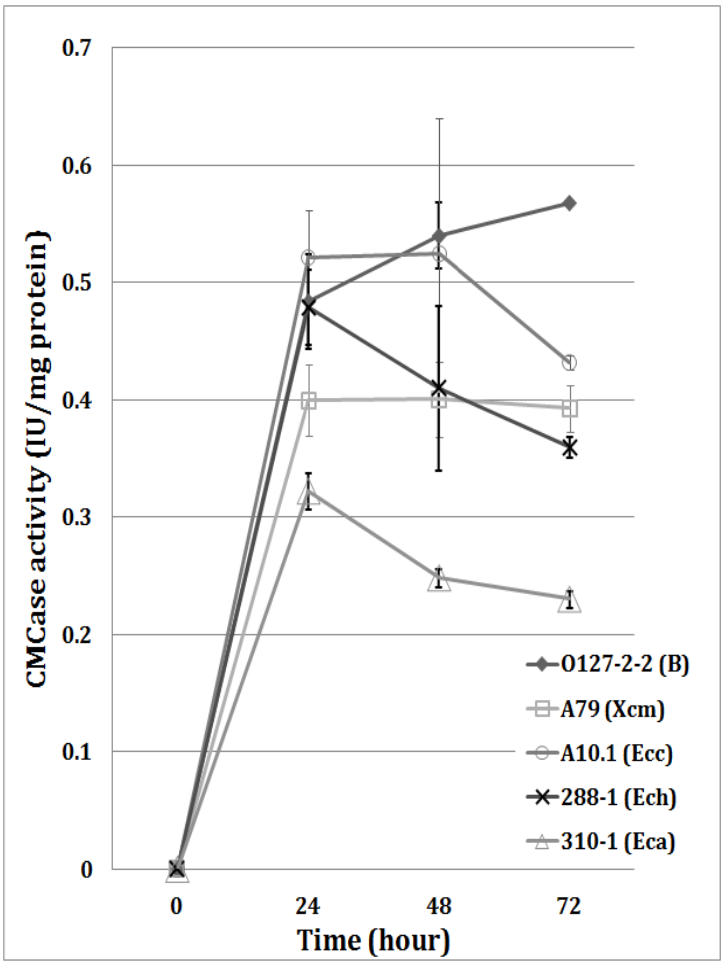
شكل 8: التغيرات الكمية في تركيز البروتينات في الرشاحة مع الزمن للعزلات المختبرة.

3-2-4- تقدير الفعالية المتخصصة لإنزيم Endoglucanase(CMCase):

لم تسجل أي قيمة للفعالية الإنزيمية عند الزمن صفر بينما كانت أعلى فعالية لإنزيم CMCase بعد 24 ساعة (أي في النصف الثاني من طور النمو الأسي) لدى العزلات A10.1، 288-1، 310-1 ، A79 بفعالية إنزيمية متخصصة قدرها 0.522، 0.47، 0.322، 0.4 وحدة إنزيمية/مغ بروتين (IU/mg protein) على التوالي كما أعطت العزلة O127-2-2 فعالية إنزيمية قدرها 0.484 وحدة إنزيمية/مغ بروتين بعد 24 ساعة (شكل 9) وهذا الإنتاج الكبير للإنزيمات في النصف الثاني من طور النمو الأسي

وخلال طور الثبات لدى البكتيريا المختبرة على اختلاف أنواعها يتفق مع ما ذكره Wood (1960) و Ariffin وزملاؤه (2006).

وقد لوحظ تناقص فعالية CMCase عند العزلة 1-310 بعد 48 ساعة وبفروق معنوية مقارنة مع القراءة الأولى (بعد 24 ساعة) حيث كانت 0.248 (IU/mg protein) واستمر الانخفاض حتى 72 ساعة حيث أصبحت0.23 (IU/mg protein) لكن بدون فروق معنوية عن الفعالية عند 48 ساعة، بينما حافظت العزلات A10.1, 1-288, A79 على نفس المستوى من الفعالية الإنزيمية بعد 48 ساعة حيث لم توجد فروق معنوية مقارنة مع اليوم الأول والتي كانت 0.525, 0.41, 0.4007 (IU/mg protein) ثم انخفضت بعد 72 ساعة بدون فروق معنوية مقارنة مع اليوم الثاني لدى A10.1, A79 حيث أصبحت 0.432, 0.393 (IU/mg protein) على التوالي، أما في العزلة 1-288 فقد كان الانخفاض بعد 72 ساعة بفروق معنوية حيث كانت 0.359 (IU/mg protein) (ملحق 4). ويمكن تفسير عدم تزايد الفعالية CMCase مع مرور الزمن إلى تناقص تركيز مادة التفاعل الأساسية CMC في الوسط نتيجة التحلل حيث تفرز البكتيريا الإنزيمات المحللة للسلولوز إلى الوسط الخارجي كاستجابة لوجود مواد سلولوزية في الوسط (Sukumaran *et al.*, 2005). بينما يعزى تناقص الفعالية الإنزيمية بفروق معنوية لدى بعض العزلات التي تتبع الجنس *Erwinia* مثل 1-310 بعد 48 ساعة وعند العزلة 1-288 بعد 72 ساعة إلى ارتفاع تركيز الغلوكوز الناتج عن التحلل الإنزيمي لمادة CMC في الوسط حيث كانت أعلى قيمة لتركيز RS بعد 48 ساعة لدى 1-310 وبعد 72 ساعة عند 1-288، حيث تعتبر التراكيز المرتفعة من الغلوكوز مثبطة لعمل CMCase كما ذكر Robson and Chambliss (1989). وبالمقابل فإن التركيز المرتفع من الغلوكوز قد يحفز بعض أنواع البكتيريا على إنتاج السيللولاز كما هو الحال لدى بعض أنواع الجنس *Bacillus* حتى أن وجوده ضروري لنسخ المورثات المسؤولة عن إنتاج Endoglucanase لدى *B. subtilis* DLG (Robson and Chambliss, 1987) وهذا ما يفسر تزايد فعالية CMCase عند O127-2-2 مع مرور الزمن بفروق معنوية حيث كانت الفعالية 0.48، 0.54، 0.57 وحدة إنزيمية/مغ بروتين بعد 24، 48، و72 ساعة على التوالي.

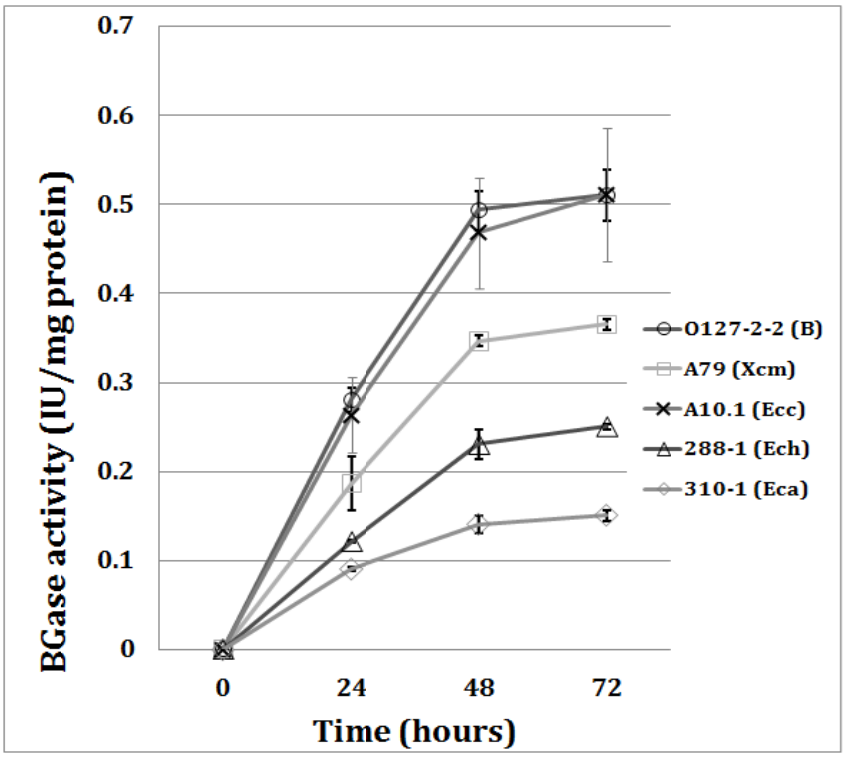


شكل 9: تغيرات الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase مع الزمن.

3-2-5- تقدير الفعالية المتخصصة لإنزيم β-Glucosidase(BGase):

أظهرت جميع العزلات المختبرة نفس الآلية لإفراز إنزيم BGase ويبين الملحق (5) والشكل (10) أن الفعالية الإنزيمية ازدادت خلال الأربع والعشرين ساعة مترافقةً مع نمو البكتيريا أسياً وبفروق معنوية بين العزلات المختبرة حيث تفوقت العزلتين A10.1 و O127-2-2 (0.186، 0.28 وحدة إنزيمية/مع بروتين) على التوالي، ثم ازدادت الفعالية بعد 48 ساعة وبفروق معنوية عن القراءة السابقة (بعد 24 ساعة) وبين العزلات المختبرة، ثم لوحظ ارتفاع طفيف وغير معنوي بعد 72 ساعة. وهذا الازدياد في الفعالية تناسب مع معدل نمو البكتيريا في الوسط حيث أنتجت البكتيريا إنزيم BGase بفعالية مرتفعة في أطوار النمو الأولى لتأمين حاجة البكتيريا من الغلوكوز الناتج من التحلل كمصدر للكربون ومن ثم لم تكن هناك زيادة معنوية في الفعالية وذلك

بسبب ارتفاع تركيز RS (بشكل غلوكوز) في الوسط الناتج عن تحلل CMC والذي يعمل على خفض الفعالية الإنزيمية لـ BGase (Xiao *et al.*, 2004; Kerppola *et al.*, 1987).



شكل 10: تغيرات الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase مع الزمن.

3-2-6- مقارنة الأنواع البكتيرية في فعاليتها المتخصصة لكل من CMCase و BGase:

تمت المقارنة بين الأنواع البكتيرية (مُمثلةً بالعزلات البكتيرية المختبرة) بالاعتماد على قيم الفعالية الإنزيمية المتخصصة لكل من CMCase و BGase بعد 24 ساعة من التحضين . حيث تم اختيار الزمن 24 ساعة للمقارنة بين العزلات المختبرة في فعاليتها الإنزيمية لأنها أعطت أعلى فعالية لإنزيم CMCase بعد 24 ساعة، باستثناء العزلة O127-2-2 التي أعطت قيماً متصاعدة لفعالية CMCase مع مرور الزمن حتى 72 ساعة، كما كانت قيم الفعالية الإنزيمية BGase لجميع العزلات (والتي اتبعت نفس النمط في إفرازها لإنزيم BGase) مرتفعة بعد 24 ساعة كذلك أشارت أبحاث عديدة إلى إفراز الإنزيمات المحللة للسلولوز بعد 24 ساعة لدى العديد من الأنواع البكتيرية مثل البكتيريا التابعة للأجناس *Erwinia* و *Xanthomonas* و *Bacillus* (Barras *et al.*, 1994; Barber *et al.*, 1997; Priest, 1977)،

وقد بينت النتائج في الجدول (20) تفوق العزلة A10.1 التي تمثل تحت النوع *Ecc* على باقي العزلات في فعالية إنزيم CMCase بفروق معنوية عن العزلتين 1-310 ,A79 التي تمثل تحت الأنواع *Eca* و *Xcm* على التوالي وبفروق ظاهرية عن كل من 1-288 و 2-2-O127 التي تمثل *Ech* و *Bacillus* sp. على التوالي.

كما تفوقت العزلتين 2-2-O127 و A10.1 بفروق معنوية على مستوى ثقة 99% على بقية العزلات في الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase ثم جاءت العزلة A79 في المرتبة الثانية واحتلت العزلتين 1-288 و 1-310 المرتبة الأخيرة حيث لم تكن الفروق معنوية بينهما على مستوى ثقة 99%، حيث يتفق ذلك مع ما ذكره Hildebrand و Schroth (1964) بأن البكتيريا المسببة لأمراض العفن الطري تتفوق في إنتاج إنزيم BGase على غيرها من الأنواع البكتيرية.

جدول 20: متوسط الفعالية الإنزيمية المتخصصة للعزلات المختبرة بعد 24 ساعة.

Bgase (IU/mg protein)	**CMCase (IU/mg protein)**	**العزلة**	**النوع**
(a)0.28 ± 0.013	(ab)0.48 ± 0.04	O127-2-2	*Bacillus* sp.
(b)0.186 ± 0.03	(cb)0.401 ± 0.03	A79	*Xcm*
(a)0.263 ± 0.042	(a)0.522 ± 0.04	A10.1	*Ecc*
(c)0.121 ± 0.001	(ab)0.48 ± 0.032	288-1	*Ech*
(c)0.091 ± 0.0025	(c)0.322 ± 0.016	310-1	*Eca*
0.06	0.084	LSD 1%	

الأرقام التي تحمل أحرفاً مشتركة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

3-3- تباين العزلات البكتيرية في فعاليتها المتخصصة لكل من CMCase وBGase :

نفذت الاختبارات على 15 عزلة بكتيرية (جدول 21)، حيث أخذت 3 عزلات من كل نوع *Ecc*, *Eca*, *Ech*, *Xcm*, *Bacillus* sp. متباينة في كفاءتها لتحليل CMC في الأطباق، وقد تم قياس الفعالية الإنزيمية

المتخصصة CMCase وBGase بعد 24 ساعة من التحضين للمقارنة بين هذه العزلات ضمن النوع الواحد، وستتم مناقشة كل جنس على حدا.

جدول 21: العزلات المختارة لإجراء اختبارات الفعالية المتخصصة لكل من CMCase وBGase واختبار القدرة الإمراضية.

العزلات Isolate	النوع Species
A10.1	*Ecc*
143-2	
A24	
310-1	*Eca*
137-2	
310-2-1	
288-1	*Ech*
EchD	
288-2-3	
O127-2-2	*Bacillus* spp.
O102-2-2	
O95-1	
RG2	*Xcm*
RG1-1	
A79	

3-3-1- الجنس *Erwinia*:

تتبع العزلات المختبرة لثلاثة تحت أنواع من الجنس *Erwinia* وهي *Ecc*، *Eca* و*Ech* التي تعرف بانتمائها للبكتيريا التي تقتل العائل للتغذي على محتويات الخلايا الميتة Nicrotrophes حيث تحدث جميعها أمراض العفن الطري على الأنسجة النباتية المختلفة وتعتمد قدرتها الإمراضية على إنتاج الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية (Buonaurio, 2008)، وقد بينت النتائج الموضحة في الجدول (22) وجود فروق معنوية بين تحت الأنواع وبين العزلات التابعة لهذا الجنس في الفعالية الإنزيمية المتخصصة حيث تفوق تحت النوع *Ecc* على كل من *Eca* و*Ech* بفروق معنوية وقد أعطت العزلة A10.1 أعلى فعالية

وبفروق معنوية عن باقي عزلات *Erwinia* وقدرها 0.59(IU/mg protein) لإنزيم CMCase و 0.3007(IU/mg protein) لإنزيم BGase.

وبالنسبة للنوع *Ech* فقد تفوقت العزلة EchD على العزلتين 288-1 و 288-2-3 بفروق معنوية وفعالية إنزيمية قدرها 0.55 ,0.26 (IU/mg protein) لكل من CMCase و BGase على التوالي. أما في تحت النوع *Eca* فقد تفوقت العزلة 310-1 على العزلتين 310-2-1 ,137-2 بفروق معنوية بفعالية إنزيمية قدرها 0.399 ,0.12 (IU/mg protein) لكل من CMCase و BGase على التوالي، بينما لم تكن الفروق معنوية بين العزلتين 310-2-1 ,137-2 في فعاليتها الإنزيمية لكل من CMCase و BGase .

جدول 22: الفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس *Erwinia* بعد 24 ساعة.

النوع	العزلة	CMCase (IU/mg protein)	BGase (IU/mg protein)
Eca	137-2	0.316 ± 0.014(e,f)	0.092 ± 0.0042(f,g)
	310-1	0.399 ± 0.013 (d)	0.12 ± 0.004(e,d)
	310-2-1	0.302 ± 0.013 (f)	0.075 ± 0.015(g)
	Mean	0.34 ± 0.05 (***)	0.094 ± 0.02 (***)
Ecc	143-2	0.54 ± 0.005(b)	0.128 ± 0.005(d)
	A10.1	0. 59 ± 0.012 (a)	0.3007 ± 0.0201 (a)
	A24	0.47 ± 0.021 (c)	0.134 ± 0.005 (d)
	Mean	0.53 ± 0.052 (*)	0.18768 ±0.085 (*)
Ech	288-1	0. 498 ±0.002 (c)	0.159 ± 0.007 (c)
	288-2-3	0.35 ± 0.03 (e)	0.1 ± 0.006 (e,f)
	EchD	0.55 ± 0.006 (a,b)	0.26 ± 0.007 (b)
	Mean	0.466 ± 0.0945(**)	0.17 ± 0.07 (**)
Control	Control	0	0
بين العزلات LSD1%		0.034	0.023
بين الأنواع LSD1%		0.02	0.013

الأرقام التي تحمل أحرفاً مشتركة والمتوسطات التي تحمل رموز مشتركة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

3-3-2- الجنس *Bacillus*:

تعتبر البكتيريا التابعة لأنواع مختلفة من الجنس *Bacillus* من الأنواع الهامة في إنتاج إنزيمات السيللولاز مثل *B. subtilis*، *B. polymyxa*، *B. licheniformis* و *B. cereus* حيث يتميز إنزيم CMCase الذي تفرزه بثباته بالحرارة (Robson and Chambliss, 1989)، وقد بينت النتائج وجود فروق معنوية بين العزلات الثلاث المختبرة من *Bacillus spp.* في الفعالية الإنزيمية لكل من CMCase و BGase حيث تفوقت العزلة O127-2-2 بفعالية إنزيمية قدرها 0.505 ,0.283 (IU/mg protein) على التوالي ، (جدول 23).

جدول 23: الفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس *Bacillus*.

العزلة	CMCase (IU/mg protein)	BGase (IU/mg protein)
O102-2-2	0.33 ± 0.006 (c)	0.069 ± 0.014 (c)
O127-2-2	0.505 ± 0.01(a)	0.283 ± 0.0081 (a)
O95-1	0.46 ±0.0035 (b)	0.212 ± 0.002 (b)
Control	0(d)	0(d)
LSD 1%	0.022	0.03

الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

3-3-3- النوع *Xcm*:

بين Daniels وزملاؤه (1988) قدرة أنواع بكتيرية تابعة للجنس *Xanthomonas* على إفراز CMCase وBGase ومنها النوع *Xcm* الذي تنتمي إليه العزلات الثلاث المختبرة حيث تفوقت العزلتان A79 و RG2في الفعالية الإنزيمية لكل من CMCase وBGase وبدون فروق معنوية بينهما حيث كانت الفعالية 0.42 ,0.2046 (IU/mg protein) على التوالي للعزلة RG2 وكانت 0.403 ، 0.194 (IU/mg

protein) للعزلة A79 RG1-1 ثانياً بفعالية إنزيمية 0.109، 0.058 (IU/mg protein) (جدول 24).

جدول 24: الفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات النوع *Xcm* بعد 24 ساعة.

BGase (IU/mg protein)	CMCase (IU/mg protein)	العزلة
0.194 ± 0.005(a)	0.403 ± 0.017(a)	A79
0.058 ± 0.006(b)	0.109 ± 0.014(b)	RG1-1
0.2046 ± 0.007(a)	0.42 ± 0.005 (a)	RG2
0(c)	0(c)	Control
0.02	0.04	LSD 1%

الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

3-4- دراسة العلاقة بين إفراز البكتيريا للإنزيمات المحللة للسلولوز وقدرتها الإمراضية:

3-4-1- القدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Erwinia* :

أظهرت نتائج اختبار القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية المختبرة من الجنس *Erwinia* (ثلاثة عزلات من كل تحت نوع *Ecc*، *Eca*، *Ech*، والتي اختبرت فعاليتها الإنزيمية CMCase و BGase سابقاً) على شرائح البطاطا باستخدام تراكيز مختلفة من اللقاح البكتيري (10^7، 10^6، 10^5 ، 10^4، 10^3) وجود فروق معنوية مابين متوسطات أقطار تحلل الأنسجة باختلاف التركيز، حيث لوحظ ازدياد قطر التحلل بزيادة تركيز اللقاح البكتيري عند جميع العزلات (ملحق 6). وبالتالي تفوق التركيز 10^7 بفروق معنوية على باقي التراكيز المستخدمة وسجلت على هذا التركيز أعلى قيمة لمتوسط قطر التحلل عند جميع العزلات ضمن تحت الأنواع

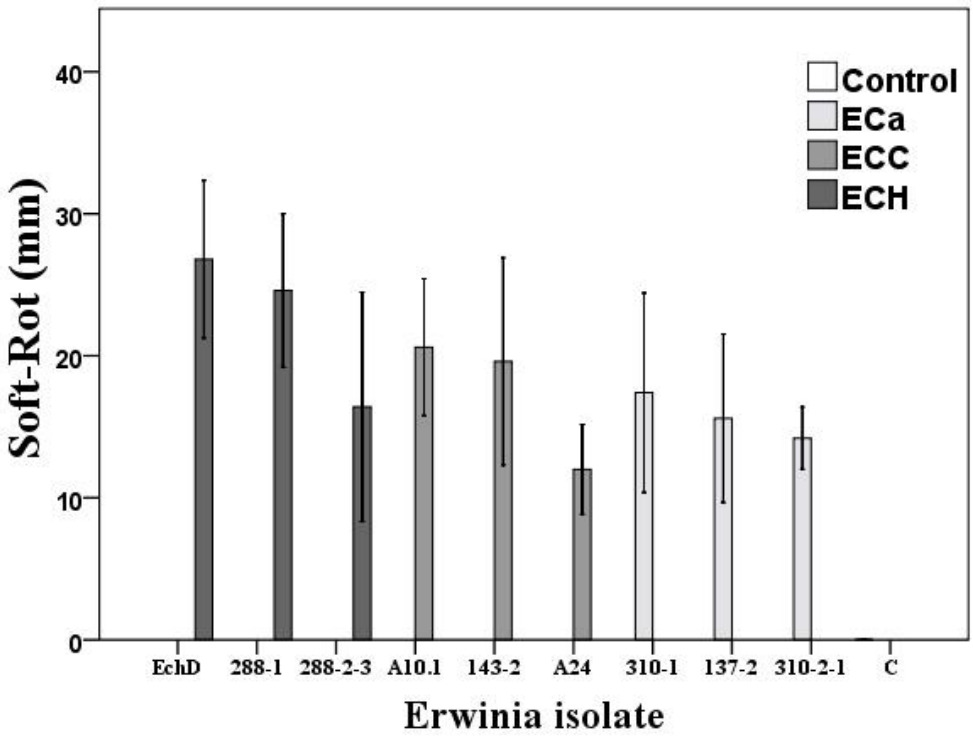
الثلاثة، وقد بلغت قيمة أعلى متوسط لقطر التحلل 26.8 مم لدى العزلة EchD على هذا التركيز بينما انخفضت لتصل 8.8 مم على تركيز 10^3 لدى نفس العزلة، كما لم تحدث العزلات 1-310، 1-2-310، 1-288، 3-2-288 تحلل للأنسجة على كل من التراكيز 10^3 و 10^4 ، وبالمقابل سببت هذه العزلات تحلل للأنسجة على شرائح البطاطا عند التراكيز المرتفعة 10^7، 10^6، 10^5 ويعزى ذلك لأن بكتيريا الجنس *Erwinia* (مثل غالبية البكتريا الممرضة للنبات) تبدأ بمهاجمة الأنسجة النباتية وبالتالي ظهور أعراض التحلل عندما تصل كثافة الخلايا البكتيرية إلى عتبة معينة (حوالي 10^7– 10^8 خلية بكتيرية في غرام من النسيج النباتي) كما ذكر Perombelon (2002)، حيث يتم التحكم بهذه العتبة من خلال ما يسمى Quorum sensing (Barnard *et al.*, 2007). واعتماداً على هذه النتيجة فقد تمت المقارنة بين العزلات في قدرتها الإمراضية على التركيز الأعلى 10^7 الذي سبب تحلل على شرائح البطاطا في جميع العزلات.

وقد بينت النتائج الموضحة في الشكل (12) تفوق النوع *Ech* على كل من *Ecc* و *Eca* بفروق معنوية بينما لم تكن الفروق معنوية بين تحت النوعين *Ecc* و *Eca*، ويعزى ذلك إلى حرارة التحضين التي نفذت فيها التجربة 27°س فقد كانت مثالية لنمو وتكاثر بكتيريا النوع *Ech* (Perombelon, 1992) بينما لم تكن مناسبة لتطور بكتيريا النوع *Eca* حيث تعتبر الحرارة المعتدلة 18°س أكثر ملائمة لنموها وتكاثرها (Peltzer and Sivasithamparam, 1985) وبالمقابل تتميز بكتيريا النوع *Ecc* بمدى حراري واسع (Toth *et al.*, 2003) ووجد أنها ذات قدرة إمراضية أكبر من *Eca* عند تحضين شرائح البطاطا على حرارة 27 °س (Mamdoh, 2001) وهذا ما يؤكد نتائج هذه الدراسة بتفوق بكتيريا *Ecc* على *Eca* بصورة ظاهرية غير معنوية، حيث تعتبر الحرارة من العوامل الهامة المؤثرة على القدرة الإمراضية لبكتيريا الجنس *Erwinia* لأنها تؤثر على فعالية الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية وخاصةً الإنزيمات المحللة للبكتين (Hasegawa *et al.*, 2005).

كما سجل تباين العزلات البكتيرية من نفس النوع في قدرتها الإمراضية على شرائح البطاطا (شكل 11) حيث جاءت العزلتين EchD و1-288 من النوع *Ech* أولاً بمتوسط قدره 26.8 و24.6 مم على التوالي ولم تكن الفروق معنوية بينهما، وبالنسبة لتحت النوع *Ecc* لم توجد فروق معنوية بين العزلتين A10.1 و2-143

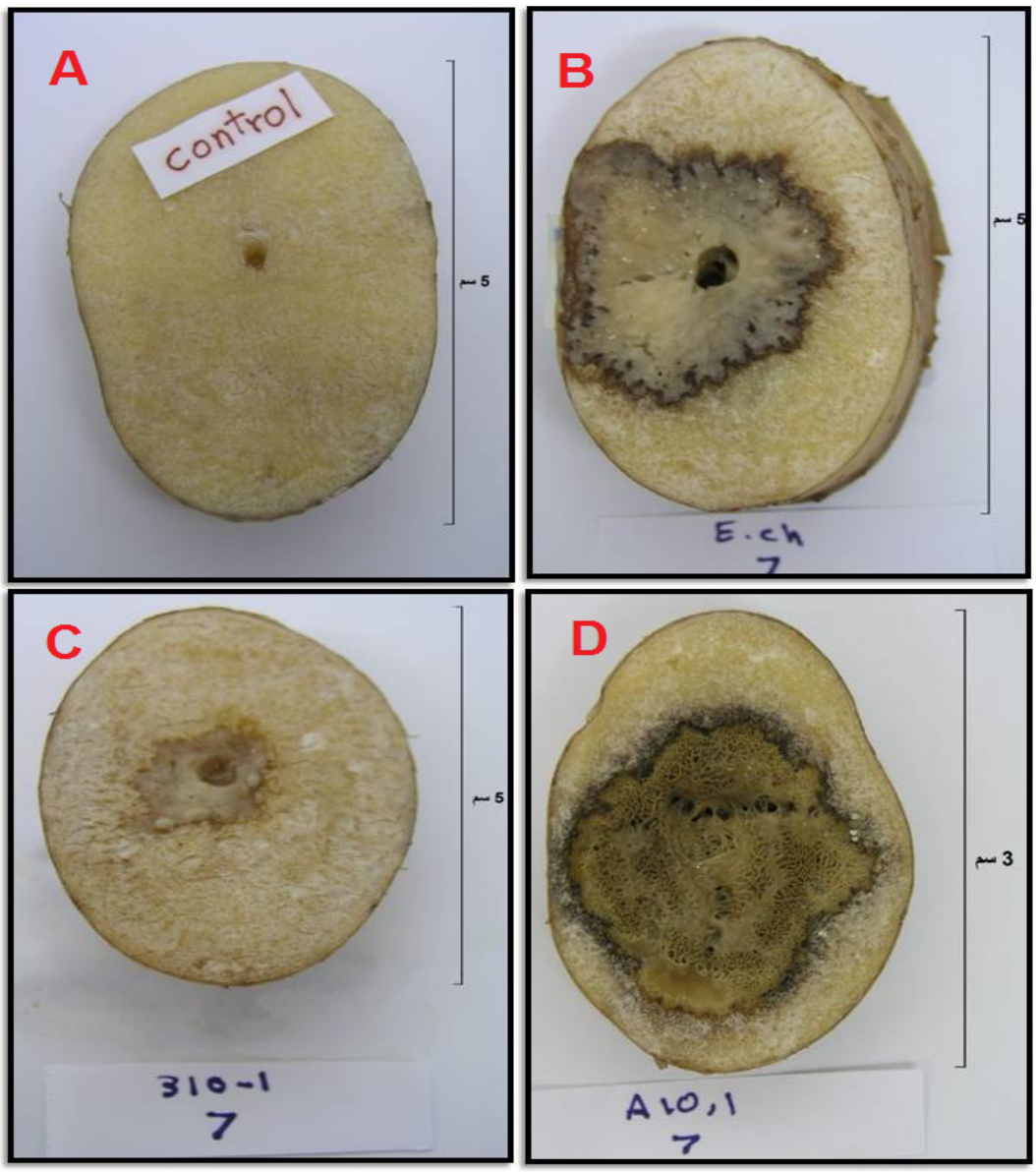
حيث كان متوسط قطر التحلل 20.6 و 19.6 مم على التوالي حيث تفوقتا على العزلة A24 التي أعطت تحلل متوسط قطره 12 مم.

وأخيراً ففي تحت النوع *Eca* تفوقت العزلة 1-310 بفروق معنوية عن العزلتين الباقيتين بتحلل متوسط قطره 17.4 مم، إن هذا الاختلاف في شراسة العزلات البكتيرية المسببة لأمراض العفن الطري التابعة لأنواع الجنس *Erwinia* يعزى إلى اختلاف النشاط الإنزيمي لهذه العزلات حيث أن العزلات الأكثر شراسة تكون عادةً ذات نشاط إنزيمي عالي (Toth *et al.*, 2003)، كما أظهرت الدراسات الكيميائية الحيوية والوراثية والمصلية وجود اختلافات كبيرة بين عزلات *Ecc* حتى المعزولة من النبات نفسه (Mee-Nagan *et al.*, 2004) كما تضم *Ech* أنماطاً حيوية Biovars مختلفة في خصائصها الحيوية والكيميائية فقد بلغ عددها تسعة أنماط اعتماداً على بعض الدراسات المرجعية (Dickey and Lelliot, 1984) بينما امتازت معظم عزلات *Eca* (90% من العزلات) بانتمائها إلى مجموعة مصلية واحدة (De Boer *et al.*, 1979).



شكل 11: متوسط قطر التحلل على شرائح البطاطا نتيجة العدوى بعزلات الجنس *Erwinia* على تركيز 10^7 بعد 24 ساعة.

وللكشف عن دور نشاط الإنزيمات المحللة للسلولوز CMCase و BGase في تحلل الأنسجة والقدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Erwinia* فقد تم إيجاد علاقة الارتباط بين القدرة الإمراضية ممثلةً بمتوسط قطر التحلل عند التركيز 10^7 والفعالية الإنزيمية CMCase و BGaseلعزلات الأنواع التابعة للجنس *Erwinia* التي حُسبت سابقاً حيث كانت قيمة معامل الارتباط 0.750 و0.783 على التوالي (جدول 25)، وهذا يدل على وجود علاقة ارتباط جيدة ومعنوية بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية، وقد تميزت عزلات النوع *Ech* بقدرتها الإمراضية العالية على عزلات تحت النوع *Ecc* بالرغم من أن الأخيرة تفوقت بفروق معنوية على عزلات *Ech* بفعاليتها الإنزيمية لكل من CMCase وBGase.



شكل 12: أعراض التحلل على شرائح البطاطا نتيجة العدوى ببكتيريا الجنس *Erwinia*.(A) الشاهد الذي استبدل فيه اللقاح البكتيري بماء مقطر معقم، (B) العزلة EchD (*Ech*)، (C) العزلة 310-1(*Eca*)، (D) العزلة A10.1(*Ecc*). وذلك بعد 24 ساعة من التحضين وعلى تركيز 10^7 خلية بكتيرية / مل.

وقد يفسر ذلك من خلال الدور الثانوي للإنزيمات المحللة للسيلولاز لدى *Ech* مقارنة مع الإنزيمات المحللة للبكتين حيث تفرز بكتيريا هذا النوع مجموعة كبيرة من الأنماط الإنزيمية المحللة للبكتين والتي تفوق بعددها ما تفرزه بكتيريا *Ecc* بينما تأتي *Eca* في المرتبة الأخيرة (Barras *et al.*, 1994; Ried and Collmer, 1986; Thomson *et al.*, 1999) وقد أشارت الدراسات المرجعية السابقة إلى الدور الثانوي للإنزيمات المحللة للسلولوز لدى أنواع *Ech* في قدرتها الإمراضية (Boyer *et al.*, 1984) بالمقابل أظهرت الفعالية الإنزيمية العالية لدى *Ecc* دوراً في قدرتها الإمراضية على البطاطا بفروق ظاهرية مقارنة مع *Eca* التي احتلت المرتبة الأخيرة في الفعالية الإنزيمية لكل من CMCase وBGase وتوافق ذلك مع الدراسات السابقة التي أوضحت أهمية الإنزيمات المحللة للسلولوز وخاصةً CelV في القدرة الإمراضية لعزلات بكتيرية لتحت النوع *Ecc* (walker *et al.*, 1994; Mäe *et al.*, 1995).

وقد أوضحت النتائج وجود ارتباط قوي بين القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية ضمن الأنواع/ تحت الأنواع و فعاليتها الإنزيمية CMCase وBGase فقد تزايدت القدرة الإمراضية لدى العزلات التي امتازت بفعالية إنزيمية عالية مثل EchD، A10.1 و1-310، بينما تناقصت لدى العزلات التي امتازت بفعالية إنزيمية أقل مثل 3-2-288، A24 و1-2-310، وهذا يتفق مع ما ذكره Beraha وزملاؤه (1974) بأن شراسة بكتيريا *E. carotovora* تتزايد مع ارتفاع فعاليتها الإنزيمية.

جدول 25: العلاقة بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس *Erwinia*.

Soft-Rot Diameter (mm)	BGase (IU/mg protein)	CMCase (IU/mg protein)	العزلة	النوع
15.6±2.97 (d,e,f)	0.092±0.004(f,g)	0.32±0.01(e,f)	137-2	***Eca***
17.40±3.5 (c,d,e)	0.12 ± 0.004(e,d)	0.39 ± 0.01 (d)	310-1	
14.2±1.09 (e,f)	0.075 ± 0.01(g)	0.30 ± 0.01 (f)	310-2-1	
15.73±2.86	0.009 ± 0.02 (3)	0.34 ± 0.05 (3)	Mean	
12±1.58 (f)	0.128 ± 0.005(d)	0.54 ± 0.005(b)	143-2	***Ecc***
20.6±2.41 (bc)	0.301±0.020 (a)	0. 59± 0.01 (a)	A10.1	
19.6±3.6 (cd)	0.134 ± 0.005 (d)	0.47 ± 0.02 (c)	A24	
17.4±4.69	0.187±0.08 (1)	0.53 ± 0.05 (1)	Mean	
24.6±2.7 (a,b)	0.159 ± 0.007 (c)	0. 49±0.002 (c)	288-1	***Ech***
16.4±4.04 (c,d,e,f)	0.100± 0.006(e,f)	0.35 ± 0.03 (e)	288-2-3	
26.8±2.77 (a)	0.26 ± 0.007 (b)	0.55±0.006 (a,b)	EchD	
22.60±5.51	0.17 ± 0.07 (2)	0.46±0.09(2)	Mean	
0(g)	0	0	Control	Control
4.25	0.023	0.034	بين العزلات LSD1%	
2.45	0.013	0.02	بين الأنواع LSD1%	
0.75*	0.983**	1	CMCase	
0.783*	1	0.983**	BGase	
1	0.783*	0.75*	Soft ROT	

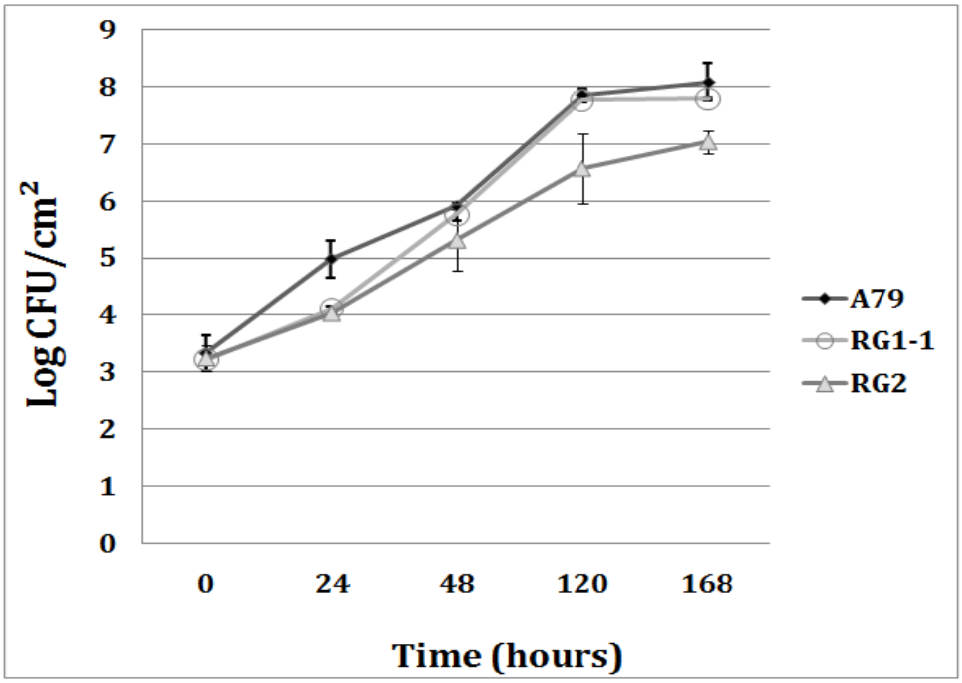
الأرقام ذات الأحرف أو الأرقام المتشابهة ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

تشير * إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.05 بينما تشير إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.01**

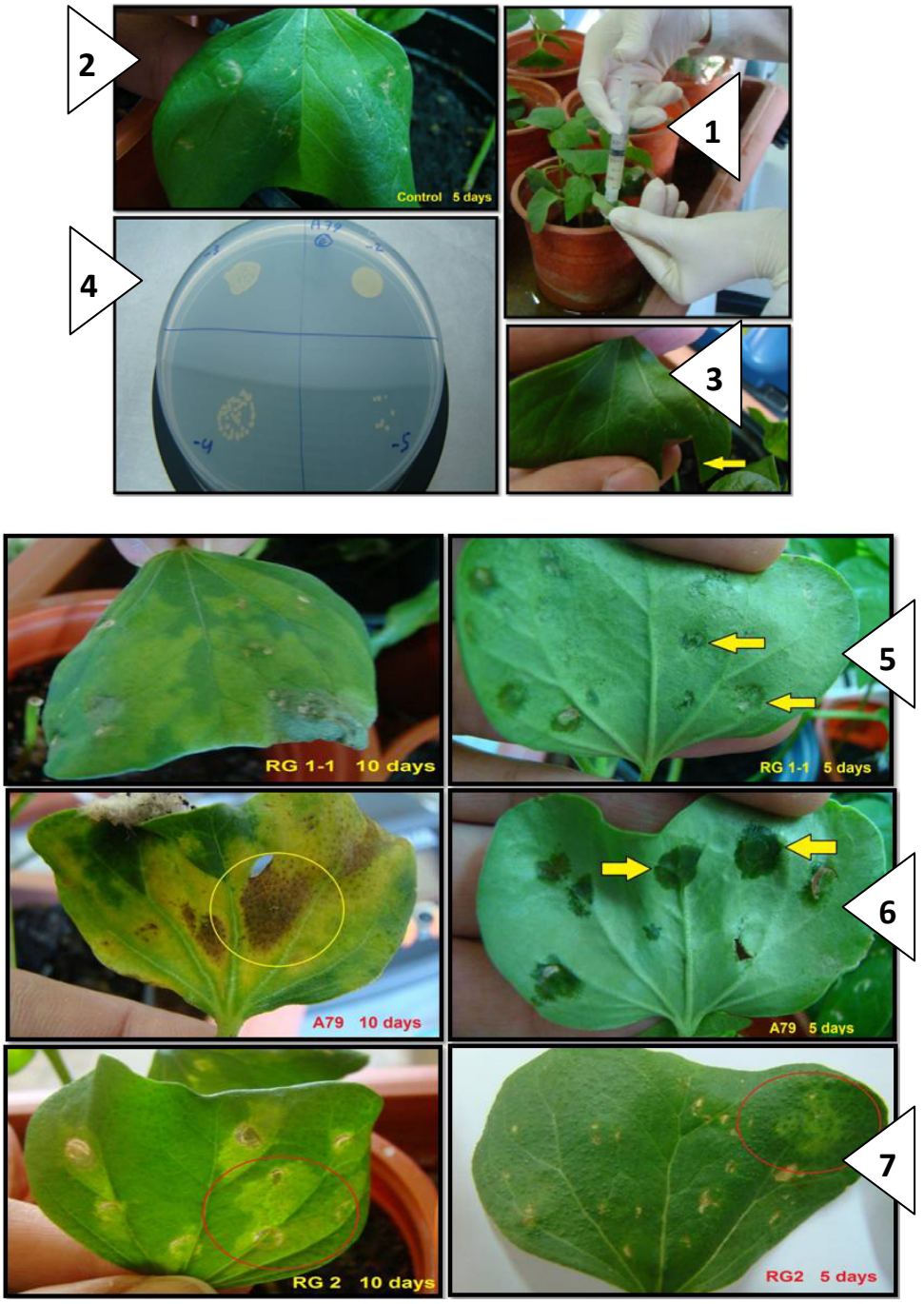
3-4-2- القدرة الإمراضية لعزلات *X. campestris* pv. *malvacearum*:

بعد إجراء عدوى الأوراق الفلقية لبادرات القطن بالعزلات البكتيرية الثلاث من النوع *Xcm* (RG2، A79، RG1-1) التي اختبرت فعاليتها الإنزيمية CMCase وBGase سابقاً، تم تقييم القدرة الإمراضية لهذه العزلات من خلال تقدير معدل نموها وتكاثرها ضمن النسيج النباتي المصاب وتوصيف الأعراض التي أحدثتها على الأوراق الفلقية، وقد تباينت الأعراض التي أحدثتها العزلات على الأوراق المعداة والتي بدأت بالظهور بعد خمسة أيام من العدوى لدى كل العزلات، حيث سببت كل من العزلتين A79 و RG1-1 أعراضاً نموذجيةً لمرض التبقع الزاوي على القطن والتي كانت على شكل بقع مائية زيتية تراوح قطرها بين 3-5 مم بعد 5 أيام من العدوى، ثم تزايدت مساحة هذه البقع بعد 7أيام لتصبح 5-8 مم ثم تحولت كامل الورقة الفلقية المصابة تقريباً إلى اللون الأصفر بعد 10 أيام من العدوى ولوحظ تماوت النسيج حول منطقة الحقن (شكل 14)، بينما سببت العزلة RG2 اصفرار النسيج النباتي حول مكان الحقن بعد 5أيام من العدوى ومن ثم تماوت النسيج المصاب تدريجياً مترافقاً مع ذبول الأوراق الفلقية المصابة (شكل 14)، وهذا توافق مع نتائج مقارنة تركيز البكتيريا ضمن 1 سم^2 من النسيج النباتي المصاب مع مرور الزمن لدى العزلات الثلاثة فقد تبين أن البكتيريا تضاعفت مع مرور الزمن بفروق معنوية حتى اليوم الخامس من العدوى (بدء ظهور الأعراض) ثم ازدادت بصورة ظاهرية غير معنوية في اليوم السابع (شكل 13)، وهذا يمكن تفسيره من خلال المقارنة مع الدراسات التي أشارت إلى أن البكتيريا *Xanthomonas campestris Pv. campestris* تستخدم جزيئات إشارة تسمى DFS (Diffusible Signal Factor) والتي تتراكم في الوسط أثناء نمو البكتيريا حتى تصل لأعلى مستوى في نهاية طور النمو الأسي وبداية طور الثبات وعندها تنتج السكريات المعقدة الخارجية EPS والإنزيمات المحللة للجدر الخلوية CWDE التي تستخدمها البكتيريا لمهاجمة خلايا النبات وبالتالي تظهر أعراض الإصابة على النسيج النباتي (Barber *et al.*, 1997; Slater *et al.*, 2000)، كما وجدت فروق معنوية بين العزلات في معدل نموها وتطورها ضمن النسيج النباتي المصاب حيث تفوقت العزلة A79 تلتها العزلة RG1-1 في المرتبة الثانية وجاءت العزلة RG2 في المرتبة الأخيرة (شكل 13) كما تبين عند مقارنة تركيز البكتيريا ضمن النسيج النباتي المصاب عند بدء ظهور أعراض الإصابة (بعد خمسة أيام من العدوى) تفوق العزلة A79 بفروق ظاهرية غير معنوية مقارنة مع العزلة RG1-1 وبفروق معنوية مقارنة مع RG2 حيث قدر متوسط لوغاريتم الوحدة المكونة للمستعمرة في 1 سم^2

من النسيج النباتي المصاب (Log CFU/cm²) 8.08 للعزلة A79 بينما كان 7.79 و7.04 لدى RG1-1 و RG2 على التوالي، وهذا يدل على تفوق A79 بقدرتها الإمراضية على RG1-1 بفروق ظاهرية غير معنوية، وعلى RG2 بفروق معنوية على مستوى الثقة 99%، حيث لم تستطع العزلة RG2 إظهار الأعراض النموذجية لمرض التبقع الزاوي على القطن المتمثلة بالبقع المائية الزيتية.



شكل 13: نمو وتطور بكتيريا *Xcm* في وحدة المساحة من النسيج النباتي المصاب.



شكل 14: اختبار القدرة الإمراضية لعزلات Xcm على القطن. (1):طريقة العدوى، (2):الشاهد، (3):طريقة أخذ العينة من النسيج النباتي المصاب، (4):عد البكتيريا في الأطباق، (5):أعراض الإصابة بالعزلة RG1-1 بعد 5 أيام من العدوى (اليمين) وبعد 10 أيام من العدوى (اليسار)، (6): أعراض الإصابة بالعزلة A79 بعد 5 أيام من العدوى (اليمين) وبعد 10 أيام من العدوى (اليسار)، أعراض الإصابة بالعزلة RG2 بعد 5 أيام من العدوى (اليمين) وبعد 10 أيام من العدوى (اليسار)،

ولتقييم دور الإنزيمات المحللة للسلولوز CMCase و BGase في القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية من النوع *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* تم حساب معامل الارتباط بين القدرة الإمراضية المتمثلة بتركيز البكتيريا في النسيج النباتي عند ظهور الأعراض بعد 5 أيام من العدوى لعزلات *Xcm* وفعاليتها الإنزيمية لكل منCMCase وBGase وكانت قيمته

0.350- و 0.450- على التوالي (جدول 26)، أي أن الارتباط سلبي وهذا يشير إلى الدور الثانوي للإنزيمات المحللة للسلولوز في القدرة الإمراضية لهذه العزلات حيث لم تُقابل زيادة الفعالية الإنزيمية للعزلة A79 عن العزلة RG1-1 بزيادة في القدرة الإمراضية بين العزلتين وهذا قد أشار إليه Gough وزملاؤه (1988, 1990) عند مقارنة القدرة الإمراضية لعزلات من *Xcc* مع *Xcc* الطافرة فاقدة للفعالية الإنزيمية CMCase على كل من الفجل Radish واللفت Turnip.

بالمقابل لم تتمكن العزلة RG2 من إحداث الأعراض النموذجية على الأوراق الفلقية لبادرات القطن بالرغم من أنها تفوقت بفعاليتها الإنزيمية لكل منCMCase وBGase بفروق ظاهرية مقارنةً مع A79 وفروق معنوية مع RG1-1 ويفسر إنتاج الإنزيمات المحللة للسلولوز بفعالية عالية من قبل العديد من الأنواع البكتيرية دون أن يكون لها دور أساسي في القدرة الإمراضية لهذه البكتيريا إلى أهمية هذه الإنزيمات عند نمو البكتيريا بشكل رمي على المواد العضوية والأنسجة النباتية الميتة (بقايا النباتات) بعيداً عن مضيفاتها النباتية الحية (Gough *et al.*, 1988)، حيث لوحظ انخفاض فعالية الإنزيمات المحللة للسلولوز لدى بكتيريا *Xcm* عند إضافة مستخلص الخميرة إلى الوسط (Huang *et al.*, 2008).

جدول 26: العلاقة بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات النوع *Xcm*.

Log CFU/cm²	BGase (IU/mg protein)	CMCase (IU/mg protein)	العزلة
7.86±0.11(a)	0.19 ± 0.005(a)	0.403 ± 0.017(a)	A79
7.757±0.02(a)	0.058 ± 0.006(b)	0.109 ± 0.014(b)	RG1-1
6.57±0.61(b)	0.205 ± 0.007(a)	0.42 ± 0.005 (a)	RG2
0(c)	0(c)	0(c)	control
1.1	0.02	0.04	LSD 1%
0.8**	1	-0.35	CMCase
1	0.8**	-0.45	Bgase
-0.45	-0.35	1	Log CFU/cm²

تشير** إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.01

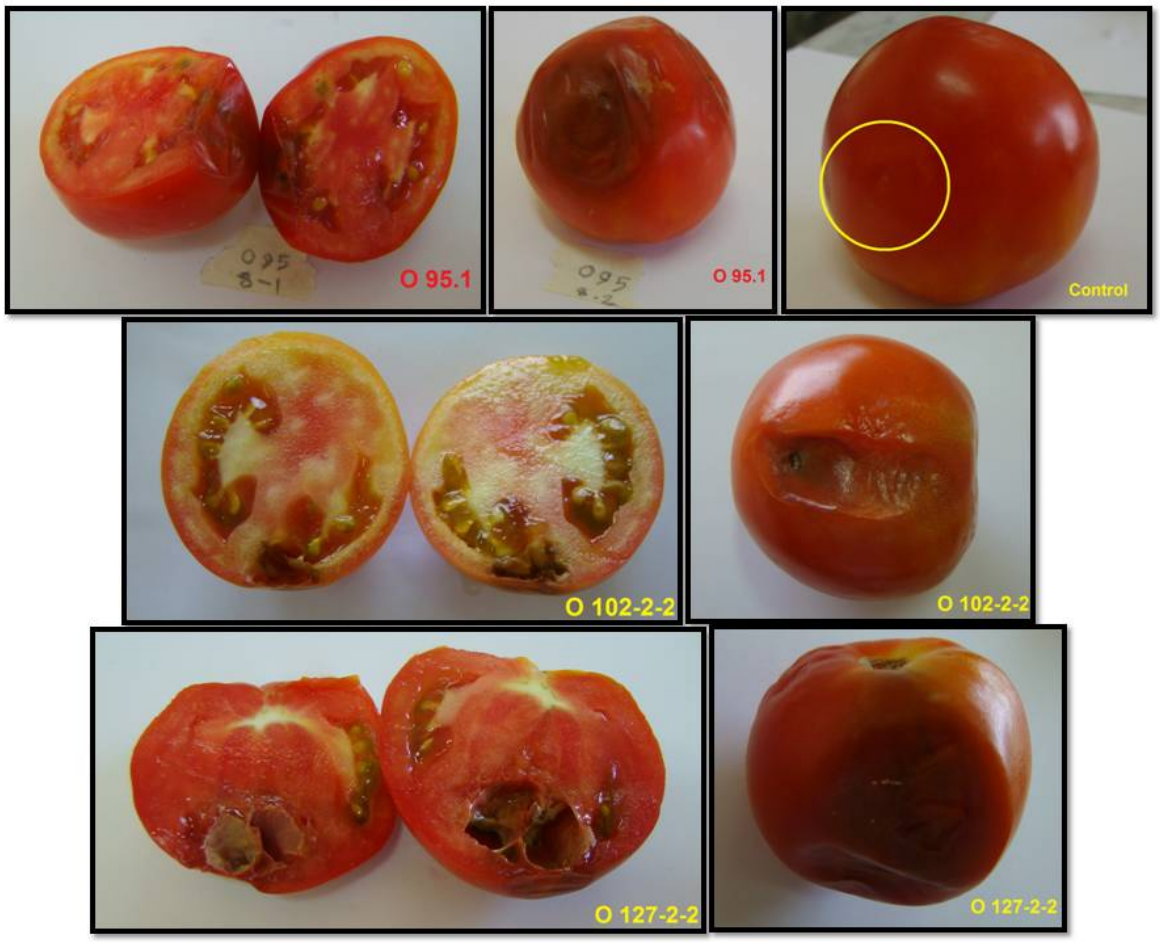
3-4-3- القدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Bacillus*:

بعد إجراء العدوى باستخدام ثلاث عزلات بكتيرية من الجنس *Bacillus* والتي اختبرت فعاليتها الإنزيمية CMCase وBGase سابقاً (O102-2-2, O95.1, O127-2-2) على ثمار البندورة بطريقة الحقن، تم قياس قطر النسيج المتحلل (مم) من ثمار البندورة بعد 72 ساعة من التحضين وقد ظهرت أعراض التحلل لدى كل العزلات عند كافة التراكيز باستثناء O95-1 حيث لم تحدث تحلل على التركيز 10^4، وقد بينت النتائج تزايد متوسط قطر التحلل مع ارتفاع تركيز اللقاح البكتيري بفروق حتى التركيز 10^7 ومن ثم لم تسبب زيادة تركيز اللقاح إلى 10^8 زيادة معنوية في قطر التحلل على الثمار المصابة (ملحق 6)، حيث سجلت على هذا التركيز أعلى قيمة لمتوسط قطر التحلل عند العزلات الثلاث، وقد بلغت 52.43، 46.63، 15.57 مم لدى كل من O127-2-2، O95.1، O102-2-2 على التوالي، بينما انخفضت قيم متوسط قطر التحلل للعزلات على التركيز 10^3 إلى 30.33، 0، 10.6 مم على التوالي (ملحق 6)، وهذا يدل على

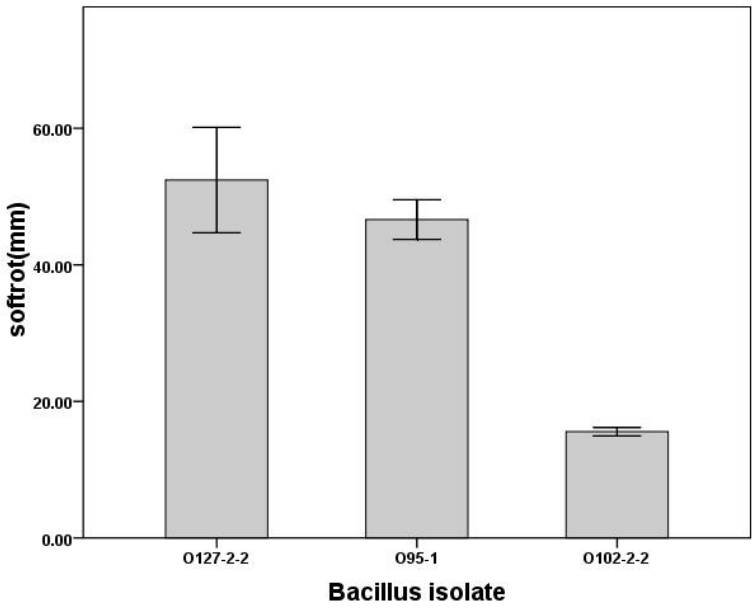
قدرة البكتيريا على التكاثر في النسيج النباتي بدون أن تسبب أية أعراض على ثمار البندورة حتى تصل لكثافة عددية مناسبة من أجل تنشيط نسخ المورثات الضرورية لمهاجمة الخلايا النباتية (Earl *et al.*, 2008)، كما أن زيادة تركيز اللقاح البكتيري تؤدي لزيادة النشاط الحيوي للبكتيريا وبالتالي إنتاج الإنزيمات اللازمة لتحلل الأنسجة النباتية (Dabai *et al.*, 2011) وبالتالي تم اختيار التركيز الأعلى 10^8 لمقارنة العزلات البكتيرية معاً في قدرتها الإمراضية.

وقد بينت النتائج الموضحة في الشكل (15) تفوق العزلة O127-2-2 بفروق معنوية على العزلتين الباقيتين وكان متوسط قطر التحلل 52.43 مم (شكل 16)، ويعود ذلك إلى اختلاف الأنواع التابعة للجنس Bacillus بنوعية وكمية الإنزيمات التي تنتجها حيث تتميز المجموعة I (والتي تنتمي إليها عدة أنواع مثل *B. polymyxa*، *B. alvei*، *B. circulans* و *B. macerans*) بإفرازها لمستويات عالية من الإنزيمات المحللة للسلولوز والبكتين إضافة لإنزيمات الأميلاز (Priest *et al.*, 1988; Priest, 1977).

ولتقييم دور الإنزيمات المحللة للسيللوز CMCase و BGase في القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية من الجنس *Bacillus*، فقد تم حساب معامل الارتباط بين القدرة الإمراضية (متمثلةً بمتوسط قطر التحلل عند التركيز 10^8) والفعالية الإنزيمية CMCase و BGase لعزلات الجنس *Bacillus* (جدول 27) حيث كانت قيمته 0.867 و 0.833 على التوالي، أي أن معامل الارتباط قوي جداً و معنوي حيث تزايدت القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية وبفروق معنوية بارتفاع فعاليتها الإنزيمية لكل من CMCase و BGase بصورة معنوية وقد توافق ذلك مع الدراسات السابقة التي أوضحت أن شراسة البكتيريا المسببة لأمراض العفن الطري مثل بكتيريا الجنس *Bacillus* تترافق مع زيادة في إفراز الإنزيمات الخارجية مثل السيللولاز (Barth *et al.*, 2009).



شكل 15: أعراض التحلل على ثمار البندورة المعداة ببكتيريا الجنس *Bacillus*.



شكل 16: متوسط قطر التحلل على ثمار البندورة المعداة بعزلات الجنس *Bacillus* بطريقة الحقن على التركيز 10^8 بعد 72 ساعة.

جدول 27: العلاقة بين القدرة الإمراضية والفعالية الإنزيمية المتخصصة لعزلات الجنس *Bacillus*.

Soft-Rot Diameter (mm)	BGase (IU/mg protein)	CMCase (IU/mg protein)	العزلة
15.567±0.3(c)	0.069 ± 0.014 (c)	0.33 ± 0.006 (c)	O102-2-2
52.43±3.86(a)	0.283 ± 0.0081 (a)	0.505 ± 0.01(a)	O127-2-2
46.63±1.46(b)	0.212 ± 0.002 (b)	0.46 ±0.0035 (b)	O95-1
0(d)	0(d)	0(d)	Control
5.67	0.03	0.022	LSD 1%
0.867**	0.933**	1	CMCase
0.833**	1	0.933**	BGase
1	0.833**	0.867**	soft rot

تشير** إلى وجود فروق معنوية على مستوى 0.01

4- الاستنتاجات:

- أظهرت العزلات البكتيرية للأنواع/تحت الأنواع *Ecc*، *Eca*، *Ech*، *Xcm*، و*Bacillus* spp. قدرتها على إفراز إنزيمات محللة للسلولوز عند اختبار قدرتها على تحليل CMC في الوسط بينما لم تسجل عزلات الأنواع *Xt*، *At*، و*Pss* أي نتيجة إيجابية.
- وجد أن الفعالية الإنزيمية لكل من CMCase وBGase عند جميع الأنواع المختبرة مرتبطة بطور نمو البكتيريا، وقد لوحظ تراكمها عند دخول البكتيريا في طور الثبات، حيث احتل تحت النوع *Ecc* المرتبة الأولى بإنتاجه لكل من CMCase وBGase.
- تأثرت فعالية إنزيمي CMCase وBGase سلباً بارتفاع تركيز الغلوكوز في الوسط لدى جميع العزلات باستثناء عزلات الجنس *Bacillus*.
- كانت البكتيريا *Ech* الأشد إمراضية تلتها في الأهمية بكتيريا *Ecc* ثم جاءت *Eca* في المرتبة الأخيرة، وبالمقابل تفوقت البكتيريا *Ecc* في فعالية إنزيمي CMCase وBGase، تلتها بكتيريا *Ech* و*Eca*.
- تزايدت القدرة الإمراضية للعزلات البكتيرية ضمن الأنواع بزيادة فعاليتها الإنزيمية، ولم يظهر للإنزيمات المحللة للسلولوز CMCase وBGase دور في القدرة الإمراضية لبكتيريا Ech مقارنة مع بكتيريا *Ecc*.
- يبدو أن الإنزيمات المحللة للسلولوز CMCase وBGase ذات دور هام في القدرة الإمراضية لعزلات الجنس *Bacillus* على ثمار البندورة، حيث ترافقت الزيادة في القدرة الإمراضية للعزلات مع ارتفاع الفعالية الإنزيمية CMCase وBGase.
- يبدو أن دور الإنزيمات المحللة للسلولوز ثانوي في القدرة الإمراضية لبكتيريا *Xcm* إذ لم تؤد الزيادة الهامة في الفعالية الإنزيمية إلى زيادة معنوية بالقدرة الإمراضية.

5- المقترحات:

- متابعة دراسة دور الإنزيمات المحللة للسلولوز وغيرها من الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية لمعرفة الدور الذي تقوم به كل من هذه الإنزيمات وبشكل خاص لدى مسببات العفن الطري.
- دراسة الخواص الإنزيمية على المستوى الجزيئي لعزلات الأنواع البكتيرية باستخدام التقانات الحيوية للتعرف على المورثات المسؤولة عن إنتاج هذه الإنزيمات والآليات المنظمة لها.
- سبر إمكانات الاستفادة من العزلات البكتيرية الممرضة للنبات المتفوقة في إنتاج الإنزيمات المحللة للسلولوز بغرض إنتاج هذه الإنزيمات كمياً.
- دراسة العوامل المؤثرة على إنتاج الإنزيمات لدى البكتيريا المسببة للعفن الطري مثل درجات الحرارة لتجنبها عند تخزين الخضار والفواكه.
- التوسع في دراسة عوامل القدرة الإمراضية لعزلات محلية من بكتيريا *Xcm* المسببة لمرض التبقع الزاوي على القطن.

6- المراجع:

References:

Abdo-Hasan, M., Khalil, H., Debis, B., and Mir Ali, N. 2008. Molecular Characterization of Syrian Races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum. Journal of Plant Pathology.* 90(3):431-439.

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, 5th. *Elsevier Academic press*.922 Pp.

Alfano, J. R., and Collmer, A. 1996. Bacterial pathogens in plants Life up Against the Wall. *The Plant Cell*. 8:1683-1698.

Ariffin, H., Abdullah, N., Hassan, M. A., Shirai, Y., and Umi Kalsom, M. S. 2006. Production and Characterisation of Cellulase by Bacillus pumilus EB3*. Journal of Engineering and Technology*. 3(1):47-53.

Ayub, M. A. Z., Heck, J. X., and Hertz, P. F. 2002. Cellulase and Xylanase Production by Isolated Amazon *Bacillus* Strains Using Soybean Residue Based Solid-State Cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:213-218.

Babana, A. H., Bathily, H., and Samake, F. 2010. *Bacillus pumilus,* a New Pathogen on Potato Tubers in Storage in Mali. *African Journal of Microbiology Research*. 4(20):2067-2071.

Bakare, M. K., Adewale, I. O., Ajayi, A., and Shonokan, O. O. 2005. Purification and Characterization of Cellulase from the Wild-Type and Two Improved Mutants of *Pseudomonas Flurescens*. *African Journal of Biotechnology*. 4(9):898-904.

Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G.m Slater, H., Dow, J. M., Williams, P., and Daniels, M. J. 1997. A Novel Regulatory System Required for Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is Mediated by a Small Diffusible Signal Molecule. *Mol. Microbiol.* 24(3):555-566.

Barnard, A. M. L., Bowden, S. D., Burr, T., Coulthurst, S. J., Monson, R. E., and Salmond, P. C. **2007**. Quorum Sensing, Virulence and Secondary

Metabolite Production in Plant Soft Rotting Bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 362:1165-1183.

Barras, F., Gisegem, F. V., and Chatterjee, A. K. 1994. Extracellular Enzymes and Pathogenesis of Soft-Rot *Erwinia*. *Annu*. *Rev*. *Phytopathology*. 32:201-234.

Barth, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., and Breidt, F. 2009. Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. in: Sperber, W. H., and Doyle, M. P. (eds.) Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. *Food Microbiology and Food Safety. Springer Science and Business Media*. pp:135-183.

Bayles, M. B., and Verhalen, L. M. 2007. Bacterial Blight Reactions of Sixty-One Upland Cotton Cultivars. *Journal of Cotton Science.*11:40-51.

Beatti, G. A., and Lindow, S. E. 1994. Epiphytic Fitness of Phytopathogenic Bacteria: Physiological Adaptation for Growth and Survival. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 192:1-27.

Bender, C. L., Alarcon,-Chaidez, F., and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation and Biosynthesis Peptide and Polyketide Synthetases. *Microbiol*. *Mol*. *Biol*. *Rev*. 63:266-292.

Beraha, L., Garber, E. D., and Billeter, B. A. 1974. Enzyme Profiles and Virulence in Mutants of *Erwinia carotovora*. *Phytopath*. Z. 81:15-22.

Boccara, M., Aymeric, J., and Camus, C. 1994. Role of Endoglucanases in *Erwinia chrysanthemi* 3937 Virulence on *Saintpaulia ionantha*. *J. Bacteriol*. 176(5):1524-1526.

Boyer, M. H., Chambost, J. P., Magnan, M., and Cattaneo, J. 1984. Carboxymethyl Cellulase from *Erwinia chrysanthemi*. Ⅱ. Purification and Partial Characterization of an Endo 1,4 glucanase *J. Biotechnology*. 1 :241-251.

Boyer, M. H., Cami, B., Chambost, J. P., Magnan, M., and Cattaneo, J. 1987. Characterization of a new endoglucanase from *Erwinia chrysanthemi*. *EUR. J. Biochem*. 162 :311-316.

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.

Brencic, A., and Winans, S. C. 2005. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant- Associated Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 69:155-194.

Buonaurio, R. 2008. Infection and Plant Defense Responses During Plant Bacterial Interaction. *Plant Microbe Interaction*. 2:169-197.

Cantu, D., Vicente, A. R., Labavitch, J. M., Bennett, A. B., and Powell, A. L. T. 2008. Strangers in the Matrix : Plant Cell Walls and Pathogen Susceptibility. *Trend in Plant Science*. 13(11):610-617.

Cheng, J., and Sun, Y. 2002. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production. *Bioresource Technology*. 83:1-11.

Chesnokova, O., Coutinho, J. B., Khan, I. H., Mikhail, M. S., and Kado, C. I. 1997. Characterization of Flagella Genes of *Agrobacterium tumefaciens,* and the Effect of a Boldn Strain on Virulence. *Mol. Microbiol.* 23:579-590.

Comai, L., Surico, G., and Kosuge, T. 1982. Relations of Plasmid DNA to Indoleacetic Acid Production in Different Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *J. Gen. Microbiol*. 128:2157-2163.

Dabai, I. A., Saulawa, A. I., Sani, A., Sahabi, D. M., Shinkafi, S. A., Aliero, A. A., and Auwal, G. 2011. Bioutilization of Adansonia Digitata Feruit Pulp by *Bacillus* species for Amylase Production. *IJPAES.*1(1):35-41.

Daniels, M. J., Dow, J. M., and Osbourn, A. E. 1988. Molecular Genetics of Pathogenicity in Phytopathogenic Bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26:285-312.

Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., et al., 2002. Comparison of the Genomes of Two *Xanthomonas* Pathogens with Differing Host Specificities. *Nature*. 417:459-463.

De Boer, S. H., Copeman, R. J., and Vruggink, H. 1979. Serogroups of *Erwinia carotovora* Potato Strains Determined with Diffusible Somatic Antifens. *Phytopathol*. 60:316-319.

Denny, T. P., and Baek, S. R. 1991. Genetic Evidence that Extracellular Polysaccharide is a Virulence Factor of *Pseudomonas solanacearum*. *MPMI*. 4:198-206.

Denny, T. P. 1995. Involvement of Bacterial Polysaccharide in Plant Pathogenesis. *Ann*. *Rev*. *Phytopathol*. 33:173-197.

Desvaux, M., Parham, N. J., Scott-Tucker, A., and Henderson, I. R. 2004. The General Secretory Pathway: a General Misnomer. *Trends Microbiol.* 12:3036-309.

Dickey, R. S., and Lelliot, R. A. 1984. Genus Ⅴ Ⅱ *Erwinia* . *Bergey's Manual of Systamatic Bacteriology*. Pp:469-476.

Duveiller, E. and Maraite, H. 1993. Study of Yield Loss due to *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in Wheat Under High Rainfall Temperate Conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection.* 100(5):453-459.

Earl, A. M., Losick, R., and Kolter, R. 2008. Ecology and Genomics of *Bacillus subtilis. Trends in Microbiology.* 16(6):269-275.

El-Helaly, A. F., Abo-El-Dahab, M. K., El-Goorani, M. A., and Gabr, M. R. 1979. Production of Cellulase (Cx) by Different Species of *Erwinia*. *Zentralbl Bakteriol Naturwiss*. 134(2):187-192.

Faucher, E., Otrysko, B., Pradis, E., Hodge, N. C., Stall, R. E., and Beaulieu, C. 1993. Characterization of *Streptomyces* Causing Russet Scab in Quebec. *Plant Disease*. 77:1217-1220.

Feulner, J. A., Lu, M., Shelton, J., Richardson, J., and Manford, R. S. 2003. Identification of Acyloxyacyl hydrolase, aLlipopolysaccharide-Detoxifying Enzyme, in the Murine Urinary Tract. *Manuscript in submission*. 185Pp.

Frederick, R. D., Chiu, J., Bennetzen, J. L., and Handa, A. K. 1997. Identification of a Pathogenicity Locus, *rpfA*, in *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* That Encodes a two-Component Sensor-Regulator Protein. *MPMI*. 10(3):407-415.

Ghose, T. M. 1987. Measurement of Cellulase Activities. *Pure. Appl. Chem.* 59(2):257-268.

Gough, C. L., Dow, J. M., Barber, C. E., and Daniels, M. J. 1988. Cloning of Two Endoglucanase Genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. plant Microbe. Interact.* 1:275-281.

Gough, C. L., Dow, J. M., Keen, J., Henrissat, B., and Daniels, M. J. 1990. Nucleotide Sequence of the *engXCA* Gene Encoding the Major Endoglucanase of *Xanthomonas campestris pv. campestris. Gene.* 89:53-59.

Goto, M., and Okabe, N. 1959. Relation Between the Activity of Cellulase"CX" and pH, Reaction Temperature or Salts. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 24(3):189-193.

Gottwald, T. R., Sun, X., Riley, T., Graham, J. H., Ferrandino, F., and Taylor, E. L. 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathol*. 92:361-377.

Hammond-Kosack, K., and Jones, J. D. G. 1996. Resistance gene-Dependent Plant Defense Responses. *Plant Cell.* 8:1773-1791.

Hasegawa, H., Chatterjee, A., Cui, Y., and Chaterjee, A. K. 2005. Elevated Temperature Enhances Virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Strain EC153 Plants and Stimulates Production of Quorum Sensing Signal, N-Acyl Homoserine Lactone, and Extracellular Protein. *App. Environ. Microbiol*. 71(8):4655-4663.

Hélias, V., Andrivon, D., and Jovan, B. 2000. Development of Symptoms Caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* under Field Conditions and their Effects on the Yield of Individual Potato Plants. *Plant Pathol*. 49:23-32.

Hildebrand, D. C., and Schroth, M. N. 1964. β-Glucosidase Activity in Phytopathogenic Bacteria. *App*. *Microbiol*. 12(6):487-491.

Hogen-hout, S. A., and Loria, R. 2008. Virulence Mechanisms of Gram-Positive Plant Pathogenic Bacteria. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 11:449-456.

Huang, Q., and Allen, C. 2000. Polygalacturonases are Required for Rapid Colonization and Full Virulence of *Ralstonia solanacearum* on Tomato Plants. *Plant Pathol*. 57:77-83.

Huang, X., Luo, Y., Rudolph, K., and Zhai, J. 2008. Identification of a Highly Virulent Strain of *Xanthomonas axonopodis* pv**.** *malvacearum*. *European Journal of Plant Pathology*. 122(4):461-469.

Ingram, L. O., Zhou, S., Yamano, L. P., Saleh, A. Z., Davis, F. C., and Aldrich, H. C. 1999. Enhancement of Expression and Apparent Secretion of *Erwinia chrysanthemi* Endoglucanase (Encoded by CelZ) in *Escherichia coli* B. *Appl. Environ. Micro.* 65(6):2439-2445.

Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R. and Eichenlaub, R. 2000. The Endo-β-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a Pathogenicity Determinant Required for Induction of Bacterial Wilt of Tomato. *MPMI*. 13(7):703-714.

Jakob, K. 2007. the Role of Pectate Lyase and the Jasmonic Acid Defense Response in *Pseudomonas viridiflava* Virulence. *Mol*. *P*. *Microb*. *Interact*. 20:146-158.

Janse. J. D. 2005. Phytobacteriology: Principles and Practice. Chapter3. *CABI Publishing.*341 Pp.

Jayani, R. S., Saxena, S., and Gupta, R. 2005. Microbial Pectinolytic Enzymes : A Review. *Process Biochemistry*. 40:2931-2944.

Jha, G., Rajeshwari, R., and Sonti, R. V. 2005. Bacterial Type Two Secretion System Secreted Proteins Double-Edged Swords for Plant Pathogens. *MPMI*. 18(9):891-898.

Kao, C. C., Barlow, E., and Sequeire, L. 1992. Extracellular Polysaccharide is required for Wild-Type Virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol*. 174:1068-1071.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., and Tewari, R. 2001. Application of Pectinases in Commercial Sector: A Review. *Bioresour Technol*. 77:215-227.

Kerppola, T. K., Serwold-Davis, T., Gross, D. C., and Kahn, M. L. 1987. Effect of Increased β-Glucosidase Activity on Virulence of *Erwinia amylovora*. *App*. *Environ*. *Microbiol*. 53(4):677-682.

King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Cli. Med.*, 44:301-307.

Klement, Z. K., and Rudolph, D. C.1990. Methods in Phytobacteriology. *Academiai Kiado, Budapest.* 121pP.

Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., Omafuvbe, B. O., and Shonukan, O. O. 2006. Purification and Biochemical Characterization of Carboxymethyl Cellulase (CMCase) from a Catabolite Repression Insensitive Mutant of *Bacillus pumilus*. *Int. J. Agri. Biol*. 8(2):286-292.

Kumar, A., Pundhir, V. S., and Gupta, K. C. 1991. The Role of Phenols in Potato Tuber Resistance Against Soft Rot by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora. Potato Research.* 34:9-16.

Kunkel, B. N., and Chen, Z. 2006. Virulence Strategies of Plant Pathogenic Bacteria. *The Prokaryotes. Springer New York Publisher*. 2:421-440.

Lagaert, S., Beliën, T., and Volckaert, G. 2009. Plant Cell Walls: Protection the Barrier From Degradation by Microbial Enzymes. *Semin. Cell & Dev. Biol.* 20(9):1064-1073.

Liao, C.-H., McCallus, D. E., and Wells, J. M. 1993. Calcium Dependent Pectate Lyase Production in the Soft Rotting Bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathol*. 83:813-818.

Liao, C.-H., McEvoy, J . L., and Smith, J. L. 2003. Control of bacterial soft rot and foodborne human pathogens on fresh fruits and vegetables. In: Huang, H.

C., and Aharya, S. N. (eds.) Advances in plant disease management. *Research Signpost, Kerala, India*. pp. 165-193.

Liu, H., Zhang, S., Schell, M. A., and Denny, T. P. 2005. Pyramiding Unmarked Deletions in *Ralstonia solanacearum* Shows that Secreted Proteins in Addition to Plant Cell-Wall Degrading Enzymes Contribute to Virulence. *Mol. P. Microb. Interact*. 18(12):1296-1305.

Lund, B. M. 1983. Bacterial spoilage. In: Dennis, C. (ed.) Post-harvest pathology of fruits and vegetables. *London*, *Academic Press, Inc., NY*. Pp. 219-257.

Mäe, A., Heikinheimo, R., and Palva, E. T. 1995. Structure and Regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193 cellulase Gene celV1 and the Role of Cellulose in Phytopathogenicity. *Mol. Gen. Genet*. (247):17-26.

Mamdoh, A. E. E. 2001. Detection and Effect of Latent Contamination of Potato Tubers by Soft Rot Bacterial, and Investigations on the Effects of Hydrogen Peroxide on Lipopolysaccharides or *Erwinia carotovora* Relation to Acquired Resistance Against Biocides. *Doctoral Dissertation, Georg Augist-University Gottingen*. 148Pp.

Manulis, S., and Barash, I. 2003. *Pantoea agglomerans* pvs. *gypsophilae* and *beta*, Recently Evolved Pathogens. *Mol*. *P*. *Pathol*. 4:307-314.

Masao, G., and Norio, O. 1958. Cellulolytic Activity of Phytopathogenic Bacteria. *Nature*. 182:p1516.

Matthysse, A. G. 1983. Role of Bacterial Cellulose Fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* Infection. *J*. *Bacteriol*. 154:906-915.

Mee-Nagan, Y., Barak, J. D., and Charkowski, A. O. 2004. Genomic Diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its Correlation with Virulence. *Plant Pathol*.pp:3013-1023.

Metzler, M. G., Laine, M. J., Haapalainen, M., Wahlroos, T., Kankare, K., Nissinen, R. and Kassuwi, S. 2000. The Cellulase Encoded by the Native

Plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *Sepedonicus* Plays a Role in Virulence and Contains Expansin-Like Domain. Physiol. Mol. P. Pathol. 57:221-233.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem*. 31(3): 426-428.

Nelson, P. E., and Dickey, R. S. 1970. Histopathology of Plant Infected with Vascular Bacterial Pathogens. Ann*. Rev. Phytopathol*. 8:259-280.

Nester, E. E. W. 2000. DNA and Protein Transfer from Bacteria to Eukaryotes : the Agrobacterium Story. *Mol*. *P*. *Pathol*. 1:87-90.

Nunn, D. 1999. Bacterial Type‖ Protein Export and Pilus Biogenesis: more than Just Homologies?*Trends Cell Biology*. 9:402-408.

Otajevwo, F. D., 2011. Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium. *Modern Applied Science. Canadian Center of Science and Education*. 5(3):141-151.

Peltzer, S., and Sivasithamparam, K. 1985. Soft-Rot *Erwinias* and Stem Rot in Potatoes. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 25:693-699.

Perombelon, M. C. M. 1992. Diversity in Erwinias as Plant Pathogens. *Plant Pathogenic Bacteria. INRA*. 66:113-128.

Perombelon, M. C. M. 2002. Potato Disease Caused by Soft Rot Erwinias: an Overview of Pathogenesis. *Plant Pathol*. 51:1-12.

Priest, F. G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews.* 41(3):711-753.

Priest, F. G., Goodfellow, M., and Todd, C. 1988. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus. J. Gen. Microbiol*. 134:1847-1882.

Rabinovich, M. L., Melnick, M. S., and Bolobova, A. V. 2002. The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes. *Biochem. Moscow*. 67(8):850-871.

Rajoka, M. I., and Malik, K. A. 1997. Cellulase Production by *Cellulomonas biazotea* Cultured in Media Containing Different Cellulosic Substrates. *Bioresource Technology*. 59(1):21-27.

Reverchon, S., Nasser, W., and Robert, J. 1994. Pec: a Locus Controlling Pectinase, Cellulase and Blue Pigment Production in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol*. *Microbiol*. 11(6): 1127-1139.

Ried, J. L., and Collmer, A. 1986. Comparison of Pectic Enzymes Produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *App. Environ. Microbiol*. 52(2):305-310.

Roberts, D. P., Denny, T. P., and Schell, M. A. 1988. Cloning of **egl** Gene of *Pseudomonas solanacearum* and Analysis of its Role in Phytopathogenicity. *JB*. 170(4):1445-1451.

Robson, L. M., and Chambliss, G. H. 1987. Cloning of the Bacillus subtilis DLG beta-1,4-glucanase gene and its expression in Escherichia coli and B. subtilis. *J. Bacteriol*. 169:2917-2025.

Robson, L. M., and Chambliss, G. H. 1989. Cellulases of Bacterial Origin. *Enzyme Microb. Technol.* 11:626-644.

Saarilahti, H. T., Henrissat, B., and Palva, E. T. 1990. CelS: an Novel Endoglucanase Identified from *Erwinia carotovora* subsp*. carotovora*. *J*. *Gene*. 90: 9-14.

Saile, E., Garvey, J. A. M. C., Schell, M. A., and Denny, T. P. 1997. Role of Extracellular Polysaccharide and Endoglucanase in Root Invasion and Colonization Tomato Plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathol*. 87(12):1264-1271.

Salmond, G. P. C. 1994. Secretion of Extracellular Virulence Factor by Plant Pathogenic Bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*32: 181-200.

Sawczyc, M. K., Barber, C. E., and Daniels, M. J. 1989. The Role in Pathogenicity of Some Related Genes in *Xanthomonas campestris* Pathovars

campestris and *translucens*: A shuttle Strategy for Cloning Genes Required for Pathogenicity. *MPMI*. 2(5):249-255.

Schell, M. A. 1987. Purification and Characterization of an Endoglucanase from *Pseudomonas solanacearum***.** *Appl*. *Environ*. *Microbiol*. 53(9):2237-2241.

Sheng, J. S., and Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium* Plant Cell DNA Transport: have Virulence Proteins, will Travel. *Plant Cell*. 8:1699-1710.

Schroter, K., Flaschel, E., Publer, A., and Beeker, A. 2001. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Secretes the Endoglucanase ENGXCA and ENGXCB : Construction of an Endoglucanase- Deficient Mutant for Industrial Xanthan Production. *App*. *Microbiol*. *Biotech*. 55:727-733.

Slater, H., Morales, A. A., Barber, C. E., Daniels, M. J., and Dow, J. M. 2000. A Two- Component System Involving an HD-GYP domain Protein Links Cell-Cell Signalling to Pathogenicity Gene Expression in *Xanthomonas campestris. Mol. Microbiol.* 38(5):986-1003.

Sobiczewski, P. 2008. Bacterial Disease of Plants: Epidemiology, Diagnostics and Control. *Zemdirbyste Agriculture*. 95(3):151-157.

Sukumaran, R. K., Singhania R. R., and Pandey, A. 2005. Microbial Cellulases Production, Applications and Challenges*. J. Sci. Ind. Res*. 64:832-844.

Surico, G., and Iacobellis, N. S. 1992. Phytohormones and Olive Knot Disease. in: Verma, D. P. S. (ed.) Molecular Signals. *Plant-Microbe Communications, CRC Press, Bocaraton, USA*. Pp:209-227.

Tamura, K., Zhu, Y. M., Sato, M., Teraoka, T., Hokosokawa, D., and Watanabe, M. 1998. Role of Coronatine Production by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* for Pathogenicity. *Ann*. *Phytopathol*. *Soc*. *Japan*. 64:299-302.

Teather, R. M., and Wood, P. J. 1982. Use of Congo Red – Polysaccharide Interaction in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol*. 43(4):777-780.

Thanassi, D. G., and Hultgren, S. J. 2000. Multiple Pathways Allow Protein Secretion Across the Bacterial Outer Membrane. *Cur. Opin. cel. Biol.* 12:420-430.

Thomashow, M. F., Panagopoulos, C., Gordon, M. P., and Nester, E. W. 1980. Host Range of *Agrobacterium tumefaciens* is Determined by the Ti-Plasmid. *Nature*. 283:794-796.

Thomson, N. R., Thomas, J. D., and Salmond, G. P. C. 1999. Virulence Determinants in the Bacterial Phytopathogen *Erwinia*. *Methods Microbiol*. 29:347-426.

Tillman, B. L., Kursell, W. S., Harrison, S. A., and Russin, J. S. 1999. Yield Loss Caused by Bacterial Streak in Winter Wheat. *Plant Disease.* 83(7):609-614.

Toth, I.K., C.J. Thorpe, S.D. Bentley, V. Mulholland, L.J. Hyman, M.C.M. Perombelon and Salmond, G.P.C.1999. Mutation in a Gene Required for Lipopolysaccharide and Enterobacterial Common Antigen Biosynthesis Affects Virulence in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*. *Mol*. *P.Microb*. *Interact*.6: 499-507.

Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C., and Brich, R. J. 2003. Soft rot *Erwiniae* : From genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*. 4(1):17-30.

Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitrorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P., and Simpson, A. J. 2002. Comparative Genomic Analysis of Plant-Associated Bacteria. *Ann. Rev. Pytopathol.* 40:169-189.

Verma, J. P., and Singh, R. P. 1971. Pectic and Cellulolytic Enzymes of *Xanthomonas Malvacearum*, the Incitant of Bacterial Blight of Cotton. *Cur. Sci*. 40(1):21-22.

Walker, D. S., Reeves, P. J., and Salmond, G. P. C. 1994. The major secreted cellulase, celV, of Erwinia carotovora subsp.carotovora is an important soft rot virulence factor. *MPMI*. 7(3):425-431.

Walton, J. D. 1994. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol*. (104):1113-1118.

Wilson, D. B. 2009. Cellulases and Biofuels. *Current Opinion* in *Biotechnology*. 20:295-299.

Wolfenden, R., and Snider, M. J. 2001. The Depth of Chemical Time and the Powder of Enzyme as Catalysts. *Acc*. *Chem*. *Res*. 34:938-945.

Wood, B. E., Beall, D. S., and Ingram, L. O. 1997. Production of Recombinant Bacterial Endoglucanase as a Co-Product with Ethanol During Fermintation Using Derivative of *Escherichia coli* Koll. *Biotechnol. Bioeng.* 55(3):547-555.

Wood, R. T. S. 1960. Pectic and Cellulolytic Enzymes in Plant Disease. *Ann. Rev. Plant. physiol*. 11:299-322.

Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., and Saddler, H. N. 2004. Effects ao Sugar Inhibition on Cellulases and β-Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substraes. *App*. *Biochem*. *Biotech*. 115(4):1115-1126.

Zhang,Y. H. P., and Lynd, L. R. 2004. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulase : Noncomplex Cellulase Systems. *Biotech*. *Bioeng*. 88:797-824.

Zhang,Y. H. P., Himmel, M. E., and Mielenz, J. R. 2006. Outlook for Cellulase Improvement : Screening and Selection Strategies. *Biotechnology Advances*. (24):452-481.

7- ملحق الجداول :

ملحق 1: التغيرات الكمية لتراكيز البكتيريا المختبرة مع مرور الزمن.

LSD 1%	الزمن				العزلة
	72H	48H	24H	0H	
0.04	(**)(a) 8.5 ± 0.02	(*)(a) 8.5 ± 0.01	(*)(b) 8.2 ± 0.02	(*)(c) 6.2± 0.00	O127-2-2
0.61	(***)(a) 8.4±0.05	(*)(a) 8.3 ± 0.02	(*)(a) 8.1 ± 0.14	(**)(b) 5.7± 0.42	A79
0.44	(*)(a) 8.7±0.01	(*)(a) 8.5 ± 0.17	(*)(b) 7.9 ± 0.27	(*,**)(c) 5.9±0.001	A10.1
0.2	(***)(a) 8.4±0.32	(*)(a) 8.3 ± 0.03	(**)(b) 7.2 ± 0.05	(*,**)(c) 6±0.13	288-1
0.12	(*)(a) 8.6±0.03	(*)(b) 8.4 ± 0.06	(**)(c) 7.1 ± 0.03	(*,**)(d) 5.9±0.05	310-1
	0.07	0.19	0.32	0.45	LSD 1%

تشير الأحرف (a، b) في نفس الصف إلى معنوية الفروق مع مرور الزمن في متوسطات B con

تشير الرموز (*,,***) في نفس العمود إلى معنوية الفروق بين العزلات في متوسطات B con**

ملحق 2: التغيرات الكمية لتراكيز السكريات المختزلة (غلوكوز) في الوسط لكل من العزلات المختبرة مع مرور الزمن.

LSD 1%	الزمن				العزلة
	72H	48H	24H	0H	
0.015	(*)(a) 0.255±0.008	(*)(b) 0.240 ± 0.003	(*)(c) 0.192 ± 0.006	(d)0	O127-2-2
0.025	(*)(a) 0.268±0.008	(*)(b) 0.232 ± 0.016	(***)(c) 0.120 ± 0.001	(d)0	A79
0.01	(*)(a) 0.252±0.005	(*)(a) 0.23 ± 0.003	(**)(b) 0.160 ± 0.006	(c)0	A10.1
0.012	(**)(a) 0.149±0.004	(**)(b) 0.120 ± 0.001	(***)(b) 0.110 ± 0.007	(c)0	288-1
0.04	(*)(a) 0.250±0.015	(*)(a) 0.244 ± 0.012	(**)(b) 0.143 ± 0.02	(c)0	310-1
	0.02	0.02	0.023	0	LSD 1%

الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

تشير الرموز(*,**,*) في نفس العمود إلى معنوية الفروق بين العزلات في متوسطات قيم RS**

ملحق 3: التغيرات الكمية لتركيز البروتينات في الرشاحة لكل من العزلات المختبرة مع مرور الزمن.

العزلة	الزمن				LSD 1%
	0H	24H	48H	72H	
O127-2-2	(c)0	(*,**)(b)0.06 ± 0.001	(*)(a)0.088 ± 0.005	(*)(a)0.095± 0.003	0.008
A79	(c)0	(***)(b)0.05 ± 0.001	(**)(a)0.069 ± 0.003	(**)(a)0.068± 0.006	0.01
A10.1	(d)0	(*,**)(c) 0.06 ± 0.001	(*)(b)0.086 ± 0.004	(*)(a)0.095 ± 0.005	0.01
288-1	(b) 0	(**,***)(a)0.053 ± 0.005	(**)(a)0.068 ± 0.004	(**)(a)0.069 ± 0.012	0.017
310-1	(c)0	(*)(b)0.065 ± 0.006	(**)(ab)0.07 ± 0.002	(**)(a)0.08 ± 0.003	0.01
LSD 1%	0	0.009	0.0088	0.0145	

الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

تشير الرموز المتشابهة (*.**.*) في نفس العمود إلى عدم وجود فروق معنوية الفروق بين العزلات**

ملحق 4: تغيرات الفعالية المتخصصة لإنزيم CMCase للعزلات المختبرة وتغيراتها مع الزمن.

LSD 1%	الزمن				العزلة
	72H	48H	24H	0H	
0.007	(*)(a) 0.57 ± 0.001	(*)(ab) 0.54 ± 0.03	(*)(b) 0.48± 0.04	0 (c)	O127-2-2
0.066	(**)(a) 0.39±0.02	(*)(a) 0.40± 0.03	(**)(a) 0.4 ± 0.03	0 (b)	A79
0.2	(**)(a) 0.43 ± 0.006	(*)(a) 0.53 ± 0.11	(*)(a) 0.52 ± 0.04	0 (b)	A10.1
0.11	(**)(c) 0.36±0.009	(*)(ab) 0.41±0.07	(*)(a) 0.48±0.032	0 (d)	288-1
0.03	(***)(b) 0.23±0.007	(**)(b) 0.25±0.008	(***)(a) 0.32±0.016	0 (c)	310-1
	0.07	0.144	0.074	0	LSD 1%

الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

تشير الرموز المتشابهة (*,**,*) في نفس العمود إلى عدم وجود فروق معنوية الفروق بين العزلات**

ملحق 5: تغيرات الفعالية المتخصصة لإنزيم BGase مع مرور الزمن لدى العزلات المختبرة.

LSD 1%	الزمن				العزلة
	72H	48H	24H	0H	
0.008	(*)(a) 0.51±0.03	(*)(a) 0.49±0.02	(*)(b) 0.28±0.01	(c)0	O127-2-2
0.01	(**)(a) 0.36±0.01	(**)(a) 0.34±0.006	(**)(b) 0.18±0.03	(c)0	A79
0.01	(*)(a) 0.51±0.07	(*)(a) 0.47±0.06	(*)(b) 0.26±0.04	(c)0	A10.1
0.017	(***)(a) 0.25±0.003	(***)(a) 0.23±0.02	(***)(b) 0.12±0.001	(c) 0	288-1
0.01	(****)(a) 0.15±0.01	(****)(a) 0.14±0.01	(***)(b) 0.09±0.002	(c)0	310-1
	0.082	0.07	0.054	0	LSD 1%

الأرقام التي تحمل أحرف متشابهة في نفس العمود ليس بينها فروق معنوية على مستوى ثقة 99%

تشير الرموز المتشابهة (*,**,*) في نفس العمود إلى عدم وجود فروق معنوية الفروق بين العزلات**

ملحق 6: متوسط قطر التحلل (مم) لعزلات الجنس *Bacillus* المختبرة على تراكيز مختلفة.

العزلة	10^4(d)	10^5(c)	10^6(b)	10^7(a)	10^8(a)
O102-2-2	10.6±0.36	11.5±0.35	13.7±1.25	14.73±0.83	15.6±0.3
O127-2	30.3±5.1	29.4±3.65	37.03±0.75	50.23±0.93	52.4±3.86
O95-1	0	32.9±3.31	34.7±1.71	42.13±2.7	46.6±1.46
Control	0	0	0	0	0
LSD 1% بين التراكيز = 2.233					

تشير الأحرف المختلفة في نفس الصف إلى فروق معنوية بين متوسطات أقطار التحلل التي أحدثتها البكتيريا على تراكيز مختلفة

The importance of cellulolytic enzymes in the pathogenicity of the tested bacterial isolates varied due to the difference in pathogenic bacterial mechanisms in attacking plant tissues, and due to different behaviors of tested bacteria, varying from near necrotrophs (soft rots bacteria) to quasi biotrophs (crown gall and olive knot bacteria). The last category showed no cellulolytic activity. But the most of tested isolates gave a rather high cellulolytic activity, and these may be useful for production of those enzymes which are important in the applied fields.

The largest diameter of maceration was at 10^7 CFU/ml after 24 hours of incubation. Isolates of *Ech* were the most virulent compared with *Ecc* and *Eca*, and the isolate Ech-D (*Ech*) was significantly superior by mean of maceration diameter (26.8 mm). Statistical analysis showed a significant positive correlation between pathogenicity and cellulolytic activity. This indicates the role CMCase and BGase enzymes in the pathogenicity of *Ecc* and *Eca* isolates, while this role was secondary in the *Ech* isolates.

All *Bacillus* isolates showed high CMC degradation efficiency. The isolate O127-2-2 was the most efficient (mean 3.24), and showed the highest CMCase and BGase level mean of activity 0.48, 0.28 IU/mg protein respectively compared with the other isolates of the same genus. On the contrast of the other isolates, the *Bacillus* isolates showed a progressively increasing cellulolytic activity by the time, and this activity increased as the glucose concentration increased. Pathogenicity test on tomato fruit showed that the diameter of maceration increased by the higher concentration of inoculum until 10^7 CFU/ml. The isolate O127-2-2 was the most virulent on tomato compared with other *Bacillus* isolates (mean of soft rot zone diameter 50.23 mm), a strong and significant positive correlation was found between the pathogenicity and the Cellulolytic activity, and this indicates the important role of CMCase and BGase in *Bacillus* Pathogenicity.

All *Xcm* isolates gave close efficiency values in the CMC degradation test, except the isolate RG1-1 which was less efficient. The isolate RG3-1 showed the highest efficiency value (2.55). On the other hand results showed a significant differences between isolates in the cellulolytic activity of CMCase and BGase, and the isolate RG2 was superior. But the role of cellulolytic enzymes was secondary in the pathogenicity of *Xcm*, out of which isolates A79 and RG1-1 gave typical symptoms on cotton plants in spite of the low cellulolytic effectivity compared with the isolate RG2 which didn't give the typical leaf spot symptoms on cotton plants.

Abstract:

Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE) are very important factors of pathogenicity in plant pathogenic bacteria, especially those causing soft rot diseases. Current researches are focusing on the role of these enzymes in the bacterial virulence and symptoms severity on the host plant. As the studies about the cellulolytic enzymes are few in this field, our study aimed to detect the secretion of cellulolytic enzymes by some bacterial isolates from different genera and species, then to assess the role of these enzymes in their pathogenicity.

Fifty one plant pathogenic bacterial isolates were tested during 2009-2011, including 15 isolates of *Erwinia*, 12 isolates of *Xanthomonas*, 11 isolates of *Bacillus*, 8 isolates of *Agrobacterium tumefaciens* and 5 isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Significant differences between bacterial genera were found in carboxy methyl cellulose (CMC) degrading efficiency. *Erwinia* isolates were the most efficient, followed by *Xanthomonas* isolates and finally the *Bacillus* isolates. On the other hand no CMC degrading efficiency was found in *Xanthomonas translucens, Agrobacterium tumefaciens, and Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolates.

Isolates of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) were the most efficient in CMC degradation compared with the isolates of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) and *Erwinia chrysanthemi* (*Ech*). The isolate A10.1 (Ecc) was significantly superior in CMC degradation (the efficiency mean = 3.85), and in Endoglucanase activity (CMCase)(0.52 IU/mg protein), and in β-Glucosidase activity (BGase) (0.26 IU/mg protein). CMCase and BGase accumulated in the late exponential phase and the stationary phase of bacterial growth, also the accumulation of these enzymes was negatively affected by the increased concentration of glucose in the supernatant. The Pathogenicity of *Erwinia* isolates was tested on potato tuber slices. Results showed a significant increase in virulence at higher concentrations of bacterial inoculums.

National Commission
for Biotechnology
High Ministry

Damascus University
Faculty of Agriculture
Department of Plant
Protection

The Correlation between Pathogenicity and Cellulolytic Enzymes Secretion in some Phytopathogenic Bacterial Isolates

Thesis Submitted in partial fulfillment of the requirement for Master of agriculture (Plant protection)

presented by:

Rudaina Ahmad Ghanem

Supervisors

Dr. Mahmoud Abu-Ghorrah
Faculty of Agriculture
Damascus University

Dr.Fawaz Azmeh
Faculty of Agriculture
Damascus University

Feb. 2012