# تأثير نظام استشعار النصاب العددي عند البكتيريا Xanthomonas citri subsp. malvacearum على إنبات بذور القطن وعلى تطور مرض التبقع الزاوي

# Effect of Quorum Sensing system in *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*y on germination of cottonseeds and development of Angular Spot disease

علي يونس (1) محمود أبوغرة (2) منال داغستاني (3)

Ali Younes(1) Mahmoud Abogurrah(2) Manal Daghestani(3)

(1) طالب دكتوراه، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(1) Ph.D student, Plant Protection department, Faculty of Agriculture , Damascus university, Syria

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(2) Plant Protection department, Faculty of Agriculture, Damascus university, Syria.

(3) قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

(3) Chemistry Department, Faculty of Science, Damascus university, Syria.

## الملخص

أجري هذا البحث خلال العام 2019-2020 في كلية الزراعة- جامعة دمشق، ويهدف إلى دراسة تقييم كفاءة الإشارة النقية DSF (≤ Sigma 90%) وخلاصة وسط زرع البكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm S101) الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (Diffusible Signal Factor) والتي تتوسط نظام الاستشعار عن النصاب العددي عند البكتيريا Xcm S101 في تحسين قدرة بذور القطن صنف حلب 33 على الإنبات وتحفيز المقاومة الجهازية للنباتات اتجاه البكتيريا Xcm S101 من خلال نقع البذور بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100µM أو بتراكيز مختلفة من خلاصة وسط الزرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (0.25، 0.5، 1.25) mg\mL لمدة 6 ساعات عند درجة حرارة 28°C. أظهـــرت النتائج كفاءة كل من خلاصـــة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوية إشارات عائلة الـ DSF في التركيزين 0.25، 0.5 mg\mL والإشارة النقية الـ DSF بتركيز100 µM في تحسين القدرة الإنباتية لبذور القطن حيث بلغت نسبة الإنبات 91.67، 86.67 ، 83.33% على التوالي مقارنة مع الشـاهد الذي بلغ نسبة إنباته 73.33 % وذلك بعد 72 ساعة من تحضين البذور، كذلك أظهرت النتائج أن لزيادة تركيز خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF تأثيراً سلبياً على إنبات البذور حيث انخفضت نسبة الإنبات إلى 50 % عند التركيز 1.25 mg\mL بعد 72 ساعة من تحضين البذور مقارنة مع الشاهد، كذلك بينت النتائج أنَ النباتات المعاملة بذورها بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100 µM أو بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5 mg\mL قد حُفزت فيها مقاومة جهازية حيث انخفضت فيها شدة الإصابة بالبكتيريا Xcm S101، كما انخفض تطور البكتيريا مع الزمن مقارنة مع الشاهد.

**الكلمات المفتاحية:** DSF، إنبات، بذور القطن، مقاومة جهازية، *Xanthomonas*، (Xcm S101).

©2023 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN: 2305-5243; AIF-023 (p: 105 - 114)**

## Abstract

This research was conducted during the year 2019- 2020 at Faculty of Agriculture - Damascus University, and aims to study the evaluation of the efficiency of DSF pure signal (≥ Sigma 90%) and DSFs (Diffusible Signal Factor) family- containing extract of culture of the bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm S101), which mediated Quorum Sensing (QS) in Xcm S101 at improving the germination ability of cottonseeds Aleppo (33), and inducing the systemic resistance of plants to bacteria Xcm S101 by soaking the seeds in DSF pure signal at concentration of 100 µM or different concentrations of DSFs-containing extract of culture of DSFs-containing extract of culture of the Xcm S101 at (0.25, 0.5, 1.25) mg/mL for 6 hours at 28 C°. The results showed the efficiency of each of DSFs-containing extract of culture of the Xcm S101 at two concentrations 0.25, 0.5 mg/mL and DSF pure signal at concentration 100 µM at improving the germination ability of the cotton seeds, which the germination rate was 91.67-86.67 and 83.33%, respectively, comparing with the control, whose germination rate was 73.33%, after 72hr of seeds incubation, also the results showed that increasing the concentration of DSFs-containing extract of the culture of the Xcm S101 had a negative effect on the germination of the seeds, which the germination percentage decreased to 50% at concentration of 1.25 mg/mL comparing with the control after 72hr of seeds incubation. The results showed that the plants which their seeds were treated by DSF pure signal at concentration of 100 µM or with DSFs-containing extract of culture of the Xcm S101 a concentration of 0.5 mg/mL had induced systemic resistance, which the severity of infection with Xcm S101 was decreased and the development of bacteria was reduced comparing with the control.


**Key words:** DSF, germination, cottonseeds, systemic resistance, *Xanthomonas*, (Xcm S101).

## المقدمة

تحول الاهتمام العالمي إلى تطوير عوامل واستراتيجيات من شأنها تحسين القدرة الإنتاجية والإنباتية للنباتات من جهة وزيادة مقاومتها للمسببات المرضية من جهة أخرى، ومن هذه الاستراتيجيات معاملة البذور النباتية بمركبات كيميائية تعمل على تحسين الإنبات وتحفيز المناعة الطبيعية اتجاه المسببات المرضية (Pathak وزملاؤه، 2016)، ومن هذه المركبات مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة ولا سيما من النمط المقرون Cis التي تمتلك رابطة مزدوجة، هذه الصفات أعطتها هيكلاً مميزاً وحاسماً لنشاطها في تحسين القدرة الإنباتية وتحفيز المناعة الطبيعية عند بعض أنواع البذار (Amrutheh وزملاؤه، 2005؛ Knight وزملاؤه، 2001؛ Bostock، 2005)، حيث تشير مجموعة من الأبحاث الحديثة إلى أن الحموض الدهنية غير المشبعة الخارجية والداخلية تعد جيلاً جديداً من محرضات المقاومة والتي تلعب دوراً مهماً في ردود الفعل الدفاعية في النبات والتأثير على التفاعلات بين النبات والأحياء الدقيقة (Upchurch، 2008؛ Kachroo وزملاؤه، 2001، 2003؛ Savchenko وزملاؤه، 2010)، ومن هذه المشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة، عائلة الـ DSF (Diffusible Signal Fctor-family) التي تتوسط الاتصالات البكتيرية- البكتيرية [ Quorum Sensing (QS)] عند أنواع الجنس *Xanthomonas*، والتي لها خاصية مميزة مشابهة لمشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة آنفة الذكر من حيث امتلاكها للرابطة المزدوجة في الموضع 2 وحالة عـــدم التشـــبع الأمـــر الذي أظهر بأنـــها ســـمة أســـاســـية رئيسية لنشاط هذه العائلة باعتبارها جزيئات إشـــارة (Wang وزملاؤه، 2004؛ Deng وزملاؤه، 2011). وصف Wang وزملاؤه (2004) الـ DSF لأول مرة بأنه cis-11-methyl-2-dodecenoic acid عند *Xanthomomas campestris* pv. *campestris* (Xcc)، وُجد في السنوات القليلة الماضية الـ DSF عند البكتيريا *Xanthomonas* pv. *oryzae* (Xoo) (He وزملاؤه، 2010) و*Xylella fastidiosa* (Xf) (Chatterjee وزملاؤه، 2008)، كما اكتشف عدد من مشتقات جزيئة الإشارة DSF عند عدد مـن الأنواع البكتيريـة منها cis-2-dodecenoic acid (BDSF)، cis-11-methyldodeca-2,5-dienoic acid (CDSF) عنـد البكتيريـــا Xcc وXoo، و2-cis-hexadecenoic acid، 12-methyltetradecenoic acid، cis-2-tetradecenoic acid عند البكتيريا Xf (He وزملاؤه،2011؛ Zhou وزملاؤه، 2015؛ He وزملاؤه، 2015). يتحكم الـ DSF ومشتقاته بعدد من الوظائف الحيوية عند

البكتيريا المنتجة لها كاستعمار أنسجة العائل النباتي وقدرتها على النمو والتطور، حيث تنظّم تعبير مورثات الشراسة المسؤولة عن الأنزيمات الخارجية كالسيللولاز Cellulase، البروتياز Protease، الليباز Lipase، الأميلاز Amylase، والمورثات المسؤولة عن عديدات السكر الخارجية عند البكتيريا Xcc (Rigano وزملاؤه، 2007) وXoo (Rai وزملاؤه، 2015) وغيرها من الوظائف الحيوية التي يتحكم بها الـ DSF ومشتقاته. أشار Alavi وزملاؤه (2013) إلى قدرة الإشارة DSF على تحسين نمو وصحة النبات Rapeseed عند معاملة بذورها بها، كما أشار Kakkar وزملاؤه (2015) إلى أن المعاملة المسبقة لنباتات الرز بالإشارة DSF قد حفز من ردود الفعل الدفاعية والبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض الأمر الذي أدى إلى انخفاض المرض عند نبات الرز عند إصابته بالبكتيريا (Xoo). أما عند البكتيريا Xcm S101 فكانت أول دراسة للكشف عن عائلة الـ DSF أجراها (يونس وزملاؤه، 2018)، حيث اكتشف مجموعة من عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 بواسطة جهاز LC-MS، حيث وُجد أنها تنتج وتفرز سبعة مشتقات حموض دهنية تابعة لعائلة الـ DSF: Cis-11-methyl-2-dodecenoic acid (DSF) و cis-2-undecenoic acid و11-methyldodecanoic acid و Cis-11-methyldodeca2-5-dienoic acid (CDSF) و Cis-2-dodecenoic acid (BDSF) و12-methyltetradecanoic acid، ويعتبر Xcm S101 أحد أخطر الممرضات النباتية التي تصيب معظم أجزاء نبات القطن مسببة له خسائر اقتصادية كبيرة كماً ونوعاً (Young وزملاؤه، 1996).

**هدف البحث**

هدف هذا البحث إلى دراسة تأثير كل من الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF التي تتوسط نظام الاستشعار عن النصاب العددي عند البكتيريا Xcm S101 على قدرة بذور القطن صنف حلب 33 على الإنبات، وعلى تطور مرض التبقع الزاوي للنباتات المُعاملة مسبقاً بالإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارة عائلة الـ DSF.

## مواد البحث وطرائقه

**- مكان وتاريخ إجراء البحث**

أجري هذا البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية-جامعة دمشق-كلية الزراعة، خلال العام 2019-2020.

**- العزلة البكتيرية وأوساط النمو**

حُصل على العزلة البكتيرية السورية Xcm S101 (المعزولة من بذور القطن صنف حلب 33) من مخبر ممرضات النبات البكتيرية كلية الزراعة -جامعة دمشق). أما بالنسبة للأوساط الغذائية المستخدمة لتنمية البكتيريا واستخلاص جزيئات عائلة الـ DSF فاتبعت الأوساط حسب طريقة يونس وزملاؤه (2018).

**- استخلاص جزيئات عائلة الـ DSF من وسط الزرع NB**

أتبعت طريقة يونس وزملاؤه (2018)، وحُفظت خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF عند درجة حرارة -20°C لحين الاستخدام.

**- تحضير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF للتجارب**

أُتبعت طريقة (Kakkar وزملاؤه، 2015)، حيث حُلّت الإشارة النقية الـ DSF (≤Sigma90%) وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بواسطة 20% ميثانول Methanol في ماء مقطر لتحضير 1mM، 20 mg\mL على التوالي كتراكيز أساسية ثم مددت بالماء المقطر أو بالبيئة NB حسب التجربة المستخدمة حتى الحصول على التراكيز المطلوبة، ويُضاف إلى الشاهد لكل تجربة أيضاً 1% ميثانول.

**- تأثير الإشارة النقية DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة بذور القطن على الإنبات**

أُتبعت طريقة (Amruthesh وزملاؤه، 2005؛ Xie وزملاؤه، 2014) من حيث تحضير البذور مع بعض التعديلات، حيث عُقمت بذور القطن صنف حلب (33) بواسطة هيبوكلوريد الصوديوم (1.5%) لمدة دقيقتين للتخلص من أي حمولة بكتيرية أو فطرية على سطح البذور، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاثة مرات للتخلص من الأثار المتبقية من هيبوكلوريد الصودوم، ثم زُقعت بذور القطن

صنف حلب 33 بتراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF [(0.25، 0.5، 1.25) mg\ml] أو بالتركيز 100 µM من الإشارة النقية DSF (≤ 90% Sigma) أو في الماء المقطر كشاهد لمدة 6 ساعات، ثم وُضعت بين ورقتي نشاف مشربة بالمعاملات المذكورة أعلاه، وبمعدل 20 بذرة في كل طبق ولكل تركيز 3 مكررات بطريقة القطاعات العشوائية الكاملة، حُضنَت الأطباق السابقة عند درجة حرارة 28ºC ورطوبة 80% لمدة 3 أيام، رُوقبت خلال هذه الفترات كفاءة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية الـ DSF في تحسين قدرة البذور على الإنبات مقارنة مع الشاهد، وحُسبت النسبة المئوية لإنبات البذور وفق المعادلة التالية (1):

**نسبة الإنبات%= (عدد البذور المُنبتة/عدد البذور الكلية) *100% (1).**

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

**- تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في تطور البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الحقيقية لبنات القطن**

أُتبعت طريقة (Amruthesh وزملاؤه، 2005؛ Xie وزملاؤه، 2014) من حيث تحضين البذور مع بعض التعديلات، فبعد إنبات البذور ضمن أطباق التحضين السابقة، نُقلت إلى أصص حاوية على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، وحُضنت عند درجة حرارة 28ºC وبرطوبة 80%، وبعد ظهور الأوراق الحقيقة للنبات قسمت الأصص إلى قسمين؛ القسم الأول: أُجري عليها عدوى اصطناعية بطريقة الحقن بسرنغ منزوعة الإبرة بمعلق بكتيري ذو تركيز $OD_{600}$=0.1 تقريباً ($2*10^8$CFU\mL) بمعدل 4 نباتات لكل تركيز بالإضافة إلى الشاهد. أما القسم الثاني: أجري عليها عـــدوى اصطناعية (Martinez وزملاؤه، 2000) بطريقة الرش بمعلق بكتيري ذو تركيز $OD_{600}$=0.1 (~$2-3*10^8$CFU\mL) بالإضافة إلى الشاهد، وقسمت الأصص التي أجريت عليها العدوى بطريقة الرش إلى 3 قطاعات وكل قطاع يحتوي على عدد من المعاملات مساوياً للتراكيز المستخدمة بالإضافة إلى الشاهد، وكل معامل يتضمن 10 مكررات نباتية بطريقة القطاعات العشوائية الكاملة، ثم قورنت الشدة المرضية بين نباتات الشاهد والنباتات المُعاملة بذورها بإشارات عائلة بتراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بعد 10 أيام من العدوى الاصطناعية، وقُيمت شدة المرض حسب مقياس تصنيف المرض للـ (Powosol وزملاؤه، 1983) وفق ما يلي: 0 = لا توجد بقع مائية؛ 1= بقعة أو بقعتين مائيتين أقطارهما لا تتجاوز 0.5 mm؛ 2= عدد قليل من البقع المائية أقطارها بين 0.2-0.5 mm غير مندمجة؛ 3= عدد من البقع المائية أقطارها ≤ 2mm متجمعة في بعض الأحيان ولكن لا توجد اصفرار على الفلقات؛ 4= عدد من البقع المائية أقطارها بين 3-4 mm متكتلـة مع بعضها مع اصفرار الفلقات وبعضـــها يتحول إلى اللون البني؛ 5= بقع كبيـرة الحجم قطرها ≤ 5 mm مندمجة مع بعضها البعض بشكل واسع مع اصفرار النبات وتماوت الفلقات. وحُسبت الشدة المرضية لكل من الشاهد والنباتات المُعاملة بذورها بإشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 وفق المعادلة التالية (Wheeler وزملاؤه، 1969) (2):

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

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

**- تأثير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في تطور البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية لبنات القطن:**

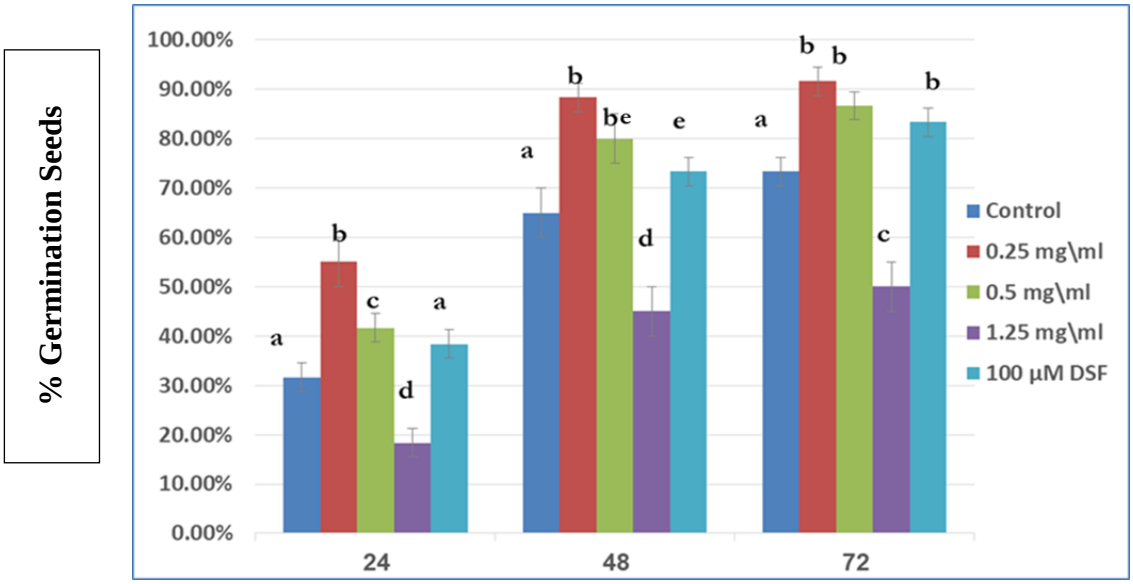
أُجريت لبذور القطن صنف حلب (33) حلاقة كيمائية بحمض الكبريت التجاري لمدة دقيقتين للتخلص من الأوبار القطنية و من أي حمولة بكتيرية أو فطرية على سطح البذور، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاثة مرات للتخلص من الأثار المتبقية من حمض الكبريت التجاري، نُقعت قسم من البذور في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5mg\mL أو بالتركيز 100 µM من الإشارة النقية DSF (≤ 90% Sigma) أو في الماء المقطر كشاهد لمدة 6 ساعات حسب طريقة (Amruthesh وزملاؤه، 2005؛ Xie وزملاؤه، 2014) وتعديلاتها، ثم نقلت البذور إلى أصص تحتوي على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، أما القسم الثاني من البذور نُقلت مباشرة إلى أصص تحتوي على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، وحُضنت الأصص عند درجة حرارة 28 ºC وبرطوبة 80%، وبعمر10 أيام للأوراق الفلقية للنباتات المعاملة بذورها بالإشارة النقية الـ DSF أو خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أجريت عدوى اصطناعية بطريقة الحقن بإبرة منزوعة السرنغ بمعلق بكتيري ذو كثافة ضوئية ($OD_{600}$=0.1) ما يقارب ($2*10^8$ CFU\mL) لكامل سطح الورقة الفلقية، أما النباتات غير المعاملة بذورها أجري عليها حقن بالإشارة النقية DSF بتركيز 100µM أو التركيز 0.5 mg\mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو بالماء المقطر كشاهد وبعد

24 ساعة من التحضين أجريت عليها عدوى اصطناعية بطريقة الحقن بإبرة منزوعة السرنغ بمعلق بكتيري ذو كثافة ضوئية ($OD_{600}$=0.1) ما يقارب ($2*10^8$ CFU\mL) لكامل سطح الورقة الفلقية، ثم حُضِّنت النباتات عند درجة حرارة 28ºC وبرطوبة 80%، وقيَم النمو البكتيري في الأنسجة النباتية بتقنية عد الصفائح حسب طريقة (Marmery وزملاؤه، 2007) خلال 10 أيام من التلقيح (0، 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10) أيام، حيث جُمعت خمسة أقراص باستخدام مسبار من الحديد ذو قطر 0.56 Cm، وعُقمت بالكحول 75% لمدة دقيقتين وغُسلت بالماء المقطر المعقم مرتين للتخلص من أثار الكحول، وسُحقت في 5 mL من الماء المقطر المعقم باستخدام هاون معقم، ثم خُفف المعلق عدة تخفيفات ($10^{-1}$، $10^{-2}$، $10^{-3}$، $10^{-4}$، $10^{-5}$، $10^{-6}$، $10^{-7}$) بالماء المقطر المعقم، ثمّ أُخذ 10 µL من كل تخفيف ووُضعت على أطباق NA وحُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28ºC لمدة 48 ساعة، ثم حُسب التركيز البكتيري في الفلقات المُلقحة، وتم التعبير عنه في الأنسجة بـ log10 CFU\$Cm^2$. كُررت التجربة ثلاث مرات دُرس من خلالها تأثير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة DSF تطور البكتيريا Xcm S101 مقارنة مع الشاهد.

## النتائج والمناقشة

### ـ تأثير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة بذور القطن على الإنبات:

أظهرت النتائج قدرة كل من الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تحسين إنبات البذور، حيث أن التركيزين (0.25، 0.5) mg\ml من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF و التركيز 100 µM من الإشارة النقية الـ DSF ذات فعالية عالية في إنبات البذور طيلة فترة التحضين حيث كانت نسبة الإنبات بعد 72 ساعة (91.67%، 86.67%، 83.33%) على التوالي مقارنة مع الشاهد الذي بلغت نسبة الإنبات فيه 73.33%، بينما التراكيز العالية من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (mg\mL 1.25) قد خفضت من نسبة إنبات للبذور حيث بلغت 50% مقارنة مع الشاهد بعد 72 ساعة من التحضين (الشكل 1)، حيث أبدت التراكيز المنخفضة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والتركيز 100µM من الإشارة النقية الـ DSF تأثيراً إيجابياً في تحسين الإنبات بينما التراكيز المرتفعة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF كان لها تأثيراً سلبياً، تطابقت هذه النتائج مع بعض الدراسات المرجعية حيث أشار Alavi وزملاؤه (2013) أن الإشارة DSF قد حسنت من إنبات بذور Rapeseed بشكل جيد كما أنها قد حسنت من نمو وصحة النبات بشكل عام.

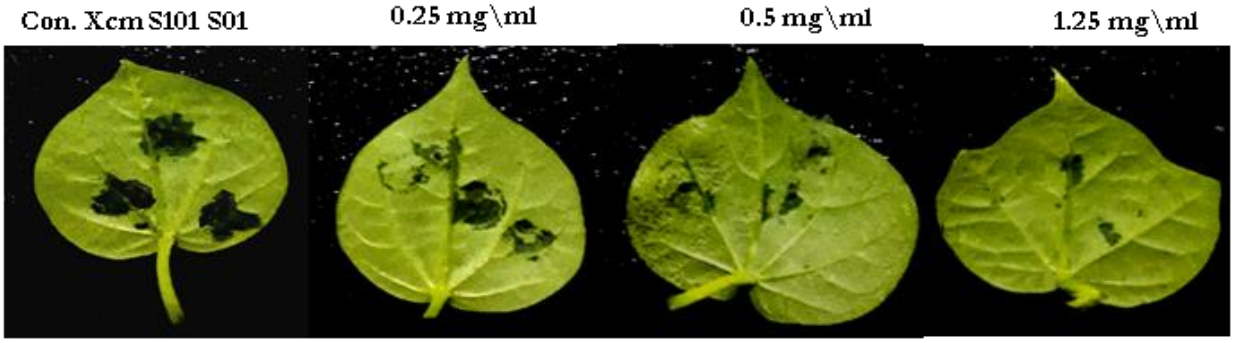



تشير الأحرف المتشابهة ضمن كل من 24، 48، 72 ساعة إلى عدم وجود فروق معنوية عند المستوى 1%.

**الشكل 1. تأثير إشارة الـ DSF النقية وخلاصة وسط الزرع لـ Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة بذور القطن صنف حلب (33) على الإنبات متمثلة بمتوسط النسبة المئوية لإنبات البذور لثلاث مكررات لكل معاملة بالإضافة للشاهد ± SD.**

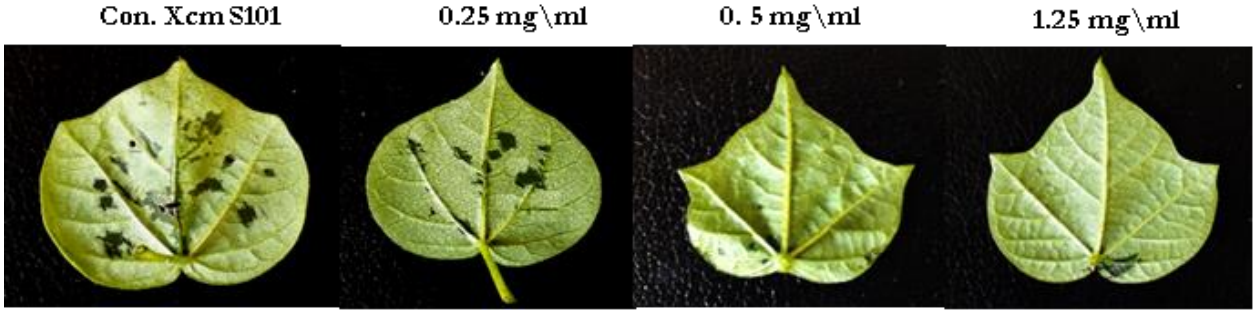
**- تأثير خلاصة وسط وزرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في تطور البكتيريا Xcm S101 على الأوراق الحقيقية**

أظهرت النتائج ظهور الأعراض المرضية بعد 96 ساعة من العدوى بطريقة الحقن بسرنغ منزوعة الإبرة متمثلة بالبقع المائية Watersoaking، وقورنت الأعراض المرضية بين الشاهد والنباتات المُعاملة بذورها بالتراكيز المختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بعد 10 أيام من ظهور الأعراض المرضية على نبات الشاهد، حيث انخفضت الشدة المرضية في النباتات المُعاملة بذورها كلما زاد تركيز خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مقارنة مع الشاهد، الأمر الذي يشير إلى تحفيز ردود الفعل الدفاعية في نبات القطن الأمر الذي حد من نمو وتطور المرض مقارنة مع الشاهد الشكل (2).




**الشكل 2. تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في تحفيز المقاومة الجهازية في نبات القطن، حيث انخفضت شدة المرض في النباتات المعاملة، حيث انخفضت الشدة المرضية كلما زاد تركيز خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101.**

أما بالنسبة للنباتات التي أُعديت بطريقة الرش فقد ظهرت البقع المائية على السطح السفلي للأوراق بعد 6 أيام من العدوى وكانت النتائج متشابهة لنتائج العدوى بطريقة الحقن، حيث قورنت الشدة المرضية بين النباتات المُعاملة بذورها بإشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 والشاهد بعد 10 أيام من ظهور الأعراض المرضية (الشكل 3).




**الشكل 3. تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تحفيز المقاومة الجهازية في نبات القطن المعاملة اتجاه البكتيريا Xcm S101، حيث انخفضت الشدة المرضية كلما زاد تركيز خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101.**

حيث انخفضت شدة المرض للنباتات المُعاملة بذورها كلما زادت تركيز خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مما يشير إلى تحفيز المقاومة الجهازية في نبات القطن الأمر الذي حد من نمو وتطور المرض مقارنة مع الشاهد، ويظهر الجدول (1) انخفاضاً معنوياً في النسبة المئوية لشدة الإصابة في النباتات المعاملة بذورها بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF مقارنة مع الشاهد غير المعامل، حيث أعطى التركيز1.25 mg\mL أعلى فعالية في تخفيض المرض وبفروق معنوية مع المعاملات الأخرى عند مستوى 5% حيث بلغت النسبة المئوية لشدة الإصابة 22% ، وتلاه التركيزين mg\mL (0.5 و 0.25) حيث بلغت النسبة المئوية لشدة الإصابة 34%، 58% على التوالي، بينما بلغت عند الشاهد 76%.

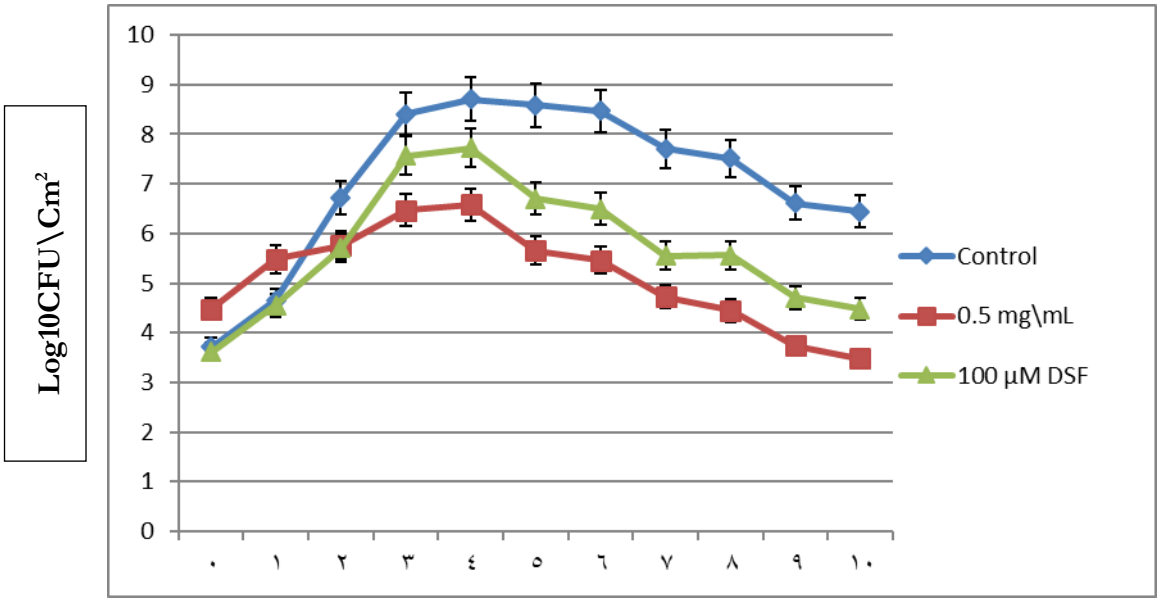
**الجدول 1. النسبة المئوية لشدة الإصابة وكفاءة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF.**

| المعاملة | 1.25 mg\mL | 0.5 mg\mL | 0.25 mg\mL | Control | L.S.D 5% |
|---|---|---|---|---|---|
| النسبة المئوية لشدة الإصابة | 22% a | 34% b | 58% c | 76% d | 3.77 |

تشير الأحرف غير المتشابهة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى ($p<0.05$).

**- تأثير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في تطور البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية للقطن**

أظهرت النتائج (الشكل 4) أن النباتات التي نُقعت بذورها بالإشارة النقية DSF بتركيز 100 µM أو بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 0.5 mg\Ml قد انخفض فيها النمو البكتيري بدءاً من الأيام الأولى من العدوى حيث وصلت إلى نسبة 10، 20 ضعفاً على التوالي مقارنة مع الشاهد بعد 4 أيام من العدوى الاصطناعية، واستمر النمو البكتيري بالانخفاض مقارنة مع الشاهد طيلة 10 أيام من العدوى الاصطناعية.




**الشكل 4. تأثير نقع بذور القطن بالإشارة النقية أوخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تطور البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية؛ حيث حسب التعداد البكتيري لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة بالإضافة إلى الشاهد ± SD.**

تشير النتائج السابقة إلى قدرة الإشارة النقية DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الحد من نمو وتطور البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية لبنات القطن، كما تشير النتائج إلى قدرتهما على تحفيز المقاومة في النبات اتجاه البكتيريا Xcm S101. أشارت بعض الدراسات المرجعية Kakkar وزملاؤه (2015) إلى أن معاملة نبات الرز مُسبقاً بالإشارة DSF قد حفز ردود الفعل الدفاعية والبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض الأمر الذي أدى إلى انخفاض المرض في نبات الرز عند إصابته بالبكتيريا Xoo، حيث أشارت الدراسات المرجعية أنّ عائلة الإشارة DSF من مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة من النمط Cis والتي لها رابطة مزدوجة عند الموضع 2، وقد ثبت أنها ميزة هيكلية رئيسية كجزيء QS فيتم التعّرف عليها من قبل النباتات بمسارات مشابهة لمسارات التعّرف على الحموض الدهنية غير المشبعة، حيث تقوم DSF بتحفيز ردود الفعل المناعية الطبيعية في النبات (Bostock 2005)، حيث أشارت الدراسات المرجعية إلى أنَ مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة الخارجية والداخلية تعد جيلاً جديداً من محرضات المقاومة والتي تلعب دوراً مهماً في ردود الفعل الدفاعية في النبات والتأثير على التفاعلات بين النبات والميكروبـــات (Upchurch، 2008؛ Kachroo وزملاؤه، 2001، 2003؛ Savchenko وزملاؤه،

2010)، إن الأحماض الدهنية الخارجيـــــة غير متوفرة بكثرة في النباتات، مثل حمض Eicosapentaenoic acid، وحمض Arachidonic acid، والتي تعتبر بمثابة محفزات قويـــــة لإحداث الاستجابة الدفاعية في النباتات الباذنجانية (Bostock وزملاؤه، 1981؛ Knight وزملاؤه، 2001)، حيث أشارت الدراسات (Amruthesh وزملاؤه، 2005) إلى أن ستة أحماض دهنية غير مشبعة وهي: حمض دوكوساهيسكانويك Docosahexaenoic (DHA)، حمض إيكوسابينتانويك Eicosapentaenoic (EPA)، حمض أراكيدونك Arachidonic acid (AA)، وحمض لينولينك linolenic acid، وحمض لينوليك Linoleic acid، وحمض أوليك Oleic acid، وجميعها تم اكتشافها في الأصل في الأبواغ الحيوانية في *Sclerospora graminicola*، على بذور أصناف حساسة من الدخن اللؤلؤي لفحص قدرتها على حماية النبات ضد العفن الفطري الناعم تحت ظروف الدفيئة والحقل. في تجارب الدفيئة، أشارت النتائج أن هذه المشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة أنفة الذكر قد أظهرت قدرتها على تحريض المقاومة في نبات الدخن اللؤلؤي عند معاملة بذور الأصناف الحساسة بهذه الأحماض، كما أظهرت النتائج زيادة نسبة الإنبات للبذور المعاملة كما زادت من صفاتها الانتاجية كماً ونوعاً، حيث اقترح العلماء أن حالة عدم تشبع من النمط Cis هو هيكل حاسم مميز لنشاط هذه الأحماض الدهنية غير المشبعة في تحفيز الاستجابـــــة الدفاعيـــــة في النباتات (Bostcok وزملاؤه، 1981، 1992؛ Bostock، 2005).

## الاستنتاجات

قدرة الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في تحسين قدرة بذور القطن على الإنبات وزيادة مقاومة النباتات فيما بعد اتجاه مرض التبقع الزاوي على القطن *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcc).

## التوصيات

يُنصح باستخدام التركيز 0.5 mg\ml من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو التركيز 100µM من الإشارة النقية الـ DSF في معاملات البذور لأنه يرفع من قدرة البذور على الإنبات بالإضافة إلى ذلك يحفز المقاومة الجهازية في النبات مما يخفض من نسبة المرض وتطوره في النبات.

## المراجع


- يونس، علي، وعايدة جلول، ومحمود أبوغرة. 2018. الكشف عن إشارات التواصل البكتيري من عائلة الـ DSF عند بكتيريا التبقع الزاوي على القطن *Xanthomonas citri* subsp.*malvacearum*. رسالة ماجستير، كلية الزراعة-جامعة دمشق.
- Alavi, P., H, Muller., M, Cardinale., C, Zachow., B. Sa´nchez., J, Martinez., G, Berg. 2013. The DSF Quorum Sensing System Controls the Positive Influence of Stenotrophomonas maltophilia on Plants. PLOS ONE. Volume 8 | Issue 7 | e67103.
- Amruthesh, K.N,., N.P, Geetha., H.J, Lyngs Jørgensen., E, de Neergaard., and H, Shekar Shetty. 2005. Unsaturated fatty acids from zoospores of Sclerospora graminicola induce resistance in pearl millet. European Journal of Plant Pathology .111: 125–137.
- Bostock, RM, JA, Kuc., Ra, Laine. 1981. Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid from Phytophthora infestans elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. Science 212,67-69.
- Bostock, RM, H, Yamamoto.,D, Choi., KE, Ricker., BL, Ward. 1992. Rapid stimulation of 5-lipoxygynase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic. Plant physiology 100. 1448-1456.
- Bostock RM. 2005. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. Annual Review of Phytopathology 43, 545–580.

- Chatterjee,A., G,Aparna., and R.V, Santi. 2008 A cell wall-degrading esterase of Xanth omonas oryzae requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. Plant Cell21: 1860-1873.
- Deng, Y., J,Wu., F,Tao., and L.H,Zhang. 2011. listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. Chem Rev. 111, 160–173.
- He,Y.W., W,Wu., J.Cha., and L.H, Zhang. 2010. Rice bacterial blight pathogen Xant homonas oryzae pv. oryzae produces multiple DSF-family signals in regula tion of virulen ce factor production. BMC Microbiol.10,187.
- He, Y.W., J,W.u., L,Zhou., F,Yang., Y.Q, He., B.L, Jiang., L,Bai., Y,Xu., Z,Deng., J.L,Tang., and L.H, Zhang. 2011. Xanthomonas campestris diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and associated 590 with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity and systemic invasion.
- He, Y.W., L, Zhou., X.Y, Wang., and B.L, Jiang. 2015. Identification and characterization of natuarlyoccuring DSF-family Quorum Sensing signal turnover system in the phytopath ogen Xanthomonas. Environ Microbiol 17:4646-4658.
- Kachroo, P., J, Shanklin., J, Shah., E.J, Whittle., D.F, Klessig. 2001. A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98, 9448–9453.
- Kachroo, P., A, Kachroo., L, Lapchyk., D, Hildebrand., D.F, Klessig. 2003. Restoration of defective cross talk in ssi2 mutants: role of Salicylic acid, jasmonic acid, and fatty acids in SSI2-mediated signaling. Molecular Plant Microbe Interactions 16, 1022–1029.
- Kakkar, A., N.R, Nizampatnam., A. K, Reddy., B. B, Pradhan., and S, Chatterjee. 2015. Xanthomonas campestris cell–cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. Journal of Experimental Botany. 212-219.
- Knight V.I., H, Wang., J.-E, Lincoln., E.C, Lulai., D.G, Gilchrist., R.M, Bostock. 2001. Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. Physiological and Molecular Plant Pathology 59, 277–286.
- Marmey, P., Jalloul, A., A, Alhamdia., M., Assigbetse., K, Cacas., J, Voloudakis., A, Champoion., A, Clerivet., A, Montillet., M, Nicole. (2007). The 9-lipoxygynase GHLOXI gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton Gossypium hirsutum to Xanthomonas campestris pv. malvacearum. Plant physiology and biochemistry. 45, 596-606.
- Martinez. C., Baccou J., Bresson., E, Baissac, Y, Jalloul, A., and Michel Nicole. (2000). Salicylic Acid Mediated by the Oxidative Burst Is a Key Molecule in Local and Systemic Responses of Cotton Challenged by an Avirulent Race of Xanthomonas campestris pv malvacearum. Plant Physiology, March 2000, Vol. 122, pp. 757–766.

- Pathak, R., G, Praveen., and S. K. Singh. (2016). Seed Priming-Mediated Induced Disease Resistance in Arid Zone Plants. Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants, DOI 10.1007/978-981-10-0388-2_5.
- Poswal, M.A., and D, Erinle. (1983). A survey of extent of infection and contamination of cotton – seed market and commercial gin sample by Xanthomonas malvacearum (E.F.Smith) Dowson in the Northern states of Nigeria. (1983). Crop protection (1983) 2 (4), 473-481.
- Rai, R., S, Javvadi., and S,hatterjee.(2015). Cell-cell signalling promotes ferric iron uptake in Xanthomonas oryzae pv. oryzicola that contribute to its virulence and growth inside rice. Mol Microbiol. doi: 10.1111/mmi.12965.
- Rigano, L.A, C, Payette., G, Brouillard., M.R, Marano., L,A bramowicz., P.S, Torres., M, Yun., A.P, Castagnaro., M.E,Oirdi., V,Dufour., F,Malamud., J.M, Dow., K, Bouarab., and A.A,Vojnov. (2007). Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. Plant Cell 19: 2077–2089.
- Savchenko,T., J.W, Walley., E.W, Chehab., Y, Xiao, R, Kaspi, M.F, Pye., M.E, Mohamed., C.M, Lazarus., R.M, Bostock., K, Dehesh. (2010). Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. The Plant Cell 22, 3193–205.
- Upchurch ,R.G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. Biotechnology Letters 30, 967–977.
- Wang,S., H.W, Lian., H,Yawen., G,Yunfeng., J-E,Wu., Y-H,Dong., C,He., L,Weng., J-L, Xu., L-T, R., X, Fang., and L-H, Zhang.(2004).A bacterial cell–cell communic ation signal with cross-kingd om structural analogues.Molecular Microbiology .doi:10. 1046.
- Wheeler, B.E.J. (1969). An introduction to plant diseases of complex etiology. Annual Review of phytopathology 16, 379-402.
- Xie, F., P, Chen., and L, Mao. (2014). Study on effect of oil- contaminated soil on seed germination. Advanced Materials research vol 864-867 (2014) pp 2532-2536.
- Young, J.M., G.S, Saddler., Y,Takikawa., B., and D.E, Stead. (1996). Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. Review of Plant Pathology, 75(9):721-763; 10 pp.
- Zhou,L., Y,Yu., X,Chen., A,Abdeen Diab., L,Ruan., J,He., H,Wang., and Y.W, He (2015). The Multiple DSF-family QS Signals are Synthesized from Carbohydrate and Branched- chain Amino Acids via the FAS Elongation Cycle. Sci. Rep. 5, 13294; doi: 10.10 38/srep 13294.


**N° Ref: 1061**