الكشف عن مشتقات الحموض الدهنية عند *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* المسببة لمرض التبقع الزاوي على القطن باستخدام تقانة الـ TLC.

Detection of fatty acid derivatives at *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* causing The Angular Spotting on Cotton using TLC analysis.

علي يونس (1) أ.د. محمود أبوغرة (2) د. عايدة جلول (2)

Ali Younes (1) Prof. Mahmoud Abo-Ghorrah (2) Dr.Aïda Jalloul (2).

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

(1) Master student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

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

(2) Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

الملخص

تفرز البكتيريا المسببة لمرض التبقع الزاوي على القطن *Xanthomons citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) مشتقات حموض دهنية حاوية على عدد من الإشارات التي تنظم تعبير عوامل الشراسة عند هذه البكتيريا، حيث أنّ إنتاج وإفراز واستقبال هذه الإشارات تقع تحت سيطرة Opern يسمى [RpF (Regulation of Pathogenicity Factors)] والذي يضم 9 مورثات [Rpf ABCD [EFGHI. خلال هذه التجربة، استخدمت العزلة Xcm S101، هذه العزلة كانت محفوظة بطريقتين، الأولى سميت بـ Xcm S101p وكانت تحت زيت البارافين عند درجة حرارة الغرفة، والثانية سميت بـ Xcm S101g وكانت بالغليسيرول (50%) عند درجة حرارة - 20°C. بينت الاختبارات الجزيئية المعتمدة على الـ PCR باستخدام بادئات متخصصة وجود طفرة في المورثة Rpf B عند العزلة Xcm S101p. كما أظهرت العدوى الاصطناعية على نباتات القطن (حلب 33) أنَ العزلة Xcm S101p فقدت قدرتها على إحداث أعراض المرض على نبات القطن مقارنة مع العزلة Xcm S101g. حُلِّلت مشتقات الحموض الدهنية المفرزة من قبل Xcm S101p وXcm S101g في وسط الزرع باستخدام كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC). أظهرت نتائج تحليل كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC بعد 48 ساعة من التلقيح وجود 6 بقع: X1، X2، X3، X4، X5، X6 مع عامل احتفاظ RF: 0.08، 0.18، 0.4، 0.51، 0.62، 0.74 على التوالي. وبينت النتائج أنّ بقع مشتقات الحموض الدهنية المنتجة من قبل العزلة Xcm S101p كانت أكثر كثافة مقارنة مع العزلة Xcm S101g، مما يشير إلى زيادة في تراكم مشتقات الحموض الدهنية في وسط الزرع.

الكلمات المفتاحية: *Xanthomons citri* subsp. *malvacearum*، Xcm S101p، Xcm S101g Rpf B، TLC، القطن، العدوى الاصطناعية.

Abstract

The bacteria *Xanthomons citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) causing The Angular Leaf Spot on Cotton secrets fatty acid derivatives, which contain a number of signals, that regulate the expression of

©2023 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN: 2305-5243; AIF-023 (p: 181 - 190)**

virulence factors. The production, secretion and reception of these signals are controlled by an operon called [RpF (Regulation of Pathogenicity Factors)], containing 9 genes [Rpf (ABCDEFGHI)]. During this study, the isolate Xcm S101 was used, this isolate was stocked in two methods, the first one named Xcm S101p was under paraffin oil at room temperature, and the second named Xcm S101g was in glycerol (50%) at -20 C°. The PCR tests depending on specific primer indicated a muta-tion in the Rpf B gene within the isolate Xcm S101p. Artificial inoculation of the cotton plants (Aleppo 33) also showed that Xcm S101p lost its ability to induce disease symptom on cotton as compared to Xcm S101g. Fatty acids derivatives secreted to culture medium of Xcm S101p and Xcm S101g were analyzed using thin layer chromatography (TLC). Results of TLC analysis of fatty acid derivatives after 48 hours of incubation revealed 6 spots: X1, X2, X3, X4, X5, X6 with retention factor (RF): 0.08, 0.18, 0.4, 0.51, 0.62, 0.74, respectively. The results demonstrate that the spots of fatty acid derivatives produced by Xcm S101p were more intense as compared to Xcm S101g, indicating an increase in the accumulation of fatty acids derivatives in culture medium.

Key words: *Xanthomons citri* subsp. *malvacearum* ،Xcm S101p ،Xcm S101g Rpf B ،TLC, Cotton ،artificial inoculation

المقدمة

يعد القطن من أهم المحاصيل الاستراتيجية في سوريا، ويأتي في المرتبة الثانية بعد النفط في تأمين القطع الأجنبي، والثالثة بعد القمح والنفط في تأمين الدخل القومي. يُصاب محصول القطن بالعديد من الآفات الحشرية والمرضية التي تسبب له تدهوراً في الإنتاج وانخفاضاً في قيمته الاقتصادية، ومن أخطر الممرضات التي تصيب معظم أجزاء نباتات محصول القطن وفي مختلف مراحل النمو بكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) (Smith وزملائه، 1901)، والتي تسبب مرض التبقع الزاوي على القطن أو ما يسمى اللفحة البكتيرية (Young وزملائه، 1996؛ Oliveira وزملائه، 2011). تتميز Xcm بأنها سالبة الغرام، عصوية الشكل، هوائية التنفس، متحركة بسوط قطبي واحد، المستعمرات مخاطية الشكل محدبة ذات حواف ناعمة، كما تفرز البكتيريا أصبغة صفراء اللون غير منحلة في الوسط الغذائي الغني بالغلوكوز تُسمى Xanthomandin، وكميات كبيرة من عديدات السكر الخارجية، (Schaad وزملائه، 2001). أشارت الدراسات الحديثة إلى أن عوامل القدرة الإمراضية التي تقوم بإنتاجها وإفرازها بكتيريا الجنس Xanthomoas كأنزيمات السيللولاز Cellulase ، البيكتيناز Pectinase، البروتياز Protease والليباز Lipase والأميلاز Amylase، وعديدات السكر الخارجية Exopolysaccaride، والـ Lipopolysaccaride عند البكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Barber وزملائه، 1997؛ Rigano وزملائه، 2007) وعند البكتيريا *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) و*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) (Qian وزملائه، 2013؛ Rai وزملائه، 2015)، وغيرها من عوامل القدرة الإمراضية كاستعمار سطح العائل النباتي (Guo وزملائه، 2012)، ومقاومة المضادات الحيوية والتأقلم مع الوسط المحيط (Deng وزملائه، 2016) خاضعة لسيطرة نظام عالي الدقة والتعقيد يسمى الـ Quorum Sensing (QS) الذي يسمح للبكتيريا باستشعار كثافتها العددية، ويتضمن إنتاج وتحرير واستقبال جزيئات صغيرة الحجم تسمى المحرضات الذاتية "Autoinducers" (Waters وBassler، 2005)، وتسمى الجزيئات الكيميائية التي تتوسط نظام QS عند بكتيريا الجنس Xanthomonas بعائلة عامل الإشارة المنحل Diffusible Signal Factor-family (DSF-family) (He وزملائه، 2010)، وهي مشتقات حموض دهنية غير مشبعة Cis-2-unsaturated (He وزملائه، 2010)، وتُصنع من الكربوهيدرات والحموض الأمينية متفرعة السلسلة عبر دورة استطالة الحمض الدهني FAS (Zhou وزملائه، 2015). ويرمز لإنتاج وإفراز عائلة الـ DSF قطعة من الـ DNA وزنها الجزيئي (21.9 kb) وتسمى بـ Regulation of Pathogencity (rpf) Factors، وتضم تسع مورثات ABCDEFGHI rpf (Barber وزملائه، 1997). وحددت وظائفها عند البكتيريا Xcc وXoo من خلال إجراء طفرات بـ Transposon mutagensis، حيث المورثة Rpf F ترمّز للبروتين RpfF الأنزيم الرئيس في إنتاج عائلة الإشارة DSF، الذي يملك وظيفتي Acyl-ACP-thioesterase وDehydratase (Zhou وزملائه، 2015). والمورثة Rpf B ترمّز للأنزيم Fatty acyl-CoA-ligase الذي يلعب دور في حركية الحموض الدهنية الحرة المشبعة المُشّكلة من قبل الفعالية الأنزيمية Thioesterase لـ RpfF، وقد بينت الدراسات أن له دور في تفكيك إشارات عائلة DSF، حيث عند حذف المورثة Rpf B أو إحداث طفرة فيها يؤدي إلى زيادة مستوى الـ DSF في معلق زرع البكتيريا Xcc (Zhou وزملائه، 2016). بينما المورثتين Rpf

C والمورثة G يشكلان نظام استقبال ونقل جزيئات عائلة DSF (Robert وMaxwell، 2011؛ Ryan وزملائه، 2011؛ Ryan وزملائه، 2015).

هدف البحث وأهميته:

انطلاقاً من أهمية دراسة الإستشعار عن النصاب العددي (Quorum sensing) عند البكتيريا، ودورها في التحكّم بعوامل القدرة الإمراضية، إضافة إلى الأضرار والخسائر الاقتصادية التي تسببها البكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) على محصول القطن عالمياً، والذي يعتبر المحصول الاقتصادي الثاني بعد القمح في سوريا. هدف هذا البحث إلى الكشف عن مشتقات الحموض الدهنية الحاوية على عائلة الإشارة DSF عند *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* المسببة لمرض التبقع الزاوي على القطن باستخدام تقانة الـ TLC.

مواد البحث وطرائقه

مكان وتاريخ إجراء البحث

أجري هذا البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية-جامعة دمشق-كلية الزراعة، خلال العام 2018-2019.

العزلة البكتيرية وأوساط النمو:

تم التزود بالعزلة البكتيرية السورية Xcm S101 المعزولة من بذور القطن صنف حلب 33 من مخبر ممرضات النبات البكتيرية كلية الزراعة - جامعة دمشق، هذه العزلة محفوظة بطريقتين الأولى بالغليسرول 50% عند درجة حرارة -20°C (نطلق عليها اسم Xcm S101g)، والثانية تحت زيت البارافين عند درجة حرارة الغرفة (نطلق عليها اسم Xcm S101p). والمستنبتات المستخدمة لتنمية البكتيريا بهدف تنشيطها ومشاهدة المستعمرات هي: وسط مستخلص الخميرة والببتون والغلوكوز والأغار الصلب (YPGA) Yeast Peptone Glucose Agar: ببيتون0.7 %، غلوكوز0.7 %، مستخلص الخميرة 0.7 %، آغار1.5 %، pH = 7. أما المستنبتات المستخدمة لاستخلاص مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة هي: الآغار المغذي Nutriet Agar (NA): ببيتون 0.5 %، مستخلص اللحم 0.3 %، سكروز 1 %، مستخلص الخميرة 0.1 %، آغار 1.5 %، pH = 7. المرق المغذي Nutreit Broth (NB): ببيتون 0.5 %، مستخلص اللحم 0.3 %، سكروز 1 %، مستخلص الخميرة 0.1 %، pH= 7. وسط مستخلص الخميرة والببتون والغليسرول PYG Peptone Yeast Glycerol: ببيتون 0.5 %، مستخلص الخميرة 0.3 %، غليسرول 2 %، pH =7 . أُتبعت طريقة He (2015) لتحضير البكتيريا من أجل استخلاص مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة، حيث نُميّت العزلة البكتيرية Xcm S101 على وسط الزرع الوسط NA، وحُضّنت عند درجة حرارة 28°C مدة 48 ساعة، ثم أُخذت مستعمرة بكتيرية واحدة ووضعت في 10مل من الوسط NYG، وحُضّنت مع الرّج على سرعة 200 دورة / دقيقة ودرجة حرارة 28°C لمدة 48 ساعة، حتى وصول تركيز المعلق البكتيري إلى كثافة ضوئية مساوية للـ1 (OD600 = 1) وتعادل CFU = 108، ثم أُخذ 1 مل من الوسط السابق وزُرع في 50 مل من نفس الوسط السابق، وحُضّنت بنفس الشروط السابقة مدة 24، 48، 72 ساعة.

العدوى الاصطناعية على نبات القطن:

زُرعت بذور القطن صنف حلب 33 في أصص تحتوي على تورب معقم، وبعمر عشرة أيام بعد الإنبات أُجريت عدوى اصطناعية للأوراق الفلقية بطريقة الحقن بمعلق بكتيري XcmS101g أو Xcm S101p بتركيز 108 cfu/ مل باستخدام محقن (سرنغ) بدون إبرة للتأكد من قدرتها الإمراضية (Martinez وزملائها، 1998).

التعريف الجزيئي:

أُجري تعريف البكتيريا جزيئياً بالاعتماد على تقانة الـ colony-PCR، باستخدام بادئات عامة RpfB1 تسمح بالكشف عن مورثة Rpf B عند البكتيريا التابعة لجنس Xanthomonas، والتي تسمح بتضخيم قطعة من المورثة وزنها الجزيئي 1636bp، وبادئات متخصصة RpfB2 تسمح بالكشف عن قطعة صغيرة من هذه المورثة وزنها الجزيئي 288 bp عند البكتيريا Xcm (Naman، Jalloul، 2015) الجدول (1).

جدول 1. البادئات المستخدمة لتحديد هوية العزلة المدروسة.

Primer name	Forward and Reverse primers	Pro. size (bp)	Most closely related sequence			
			Accession No.	Annotated function	Organism	Reference
RpfB 1	F:5-GTCCTTGGTTGCAAACTTATCC-3 R:5-AGGATCTTGCCGACGTTGG	1636	AE008922.1	Long-chain-fatty-acid-ligase	Xcc STR:ATCC 33913	Jalloul (*unpublished data*)
RpfB 2	F:5-GATCAGCTTGCCGACGTTGG-3 R:5-GGTGGTGATGACTTGCCTGA-3	288	Unpublished Syria isolated Jalloul *et.al*	Long-chain-fatty-acid-ligase	Xcm Syrian isolate	Namaan and Jalloul 2015

أُجري تفاعل PCR (25 µl حجم نهائي)، باستخدام GoTaq hot start polymerase Master Mix 2X (Promega) و12.5 pmol من البادئة المباشرة For (10 µM) و12.5 pmol من البادئة غير المباشرة Rev (10 µM) و3 µl من معلق بكتيري 107 cfu/مل، ثم أُكمل الحجم إلى 25 µl بالماء المقطر المعقم وأجرى تفاعل الـ PCR باستخدام جهاز المدور الحراري (TECHNE TC-4000) وفق البرنامج التالي : 5 دقائق عند درجة حرارة 94 °C لتكسير الخلايا البكتيرية وتنشيط الأنزيم وفصل سلسلتي الـ DNA عن بعضها، ثُليت بـ 40 دورة تضمنت [مرحلة فصل سلسلتي الـ DNA على درجة حرارة 94 °C لمدة دقيقة، ومرحلة ارتباط البادئات على درجة حرارة 62 °C و60°C بالنسبة لزوجي البادئات RpfB1 و RpfB2، على التوالي ولمدة دقيقة، ومرحلة البلمرة على درجة حرارة 72°C لمدة دقيقة ونصف لزوج البادئات RpfB1 ودقيقة لزوج البادئات RpfB2]، ثم 10 دقائق على درجة حرارة 72 °C كمرحلة أخيرة لاستكمال الاستطالة. بعد إتمام برنامج الـ PCR لدوراته كُشف عن نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي بتطبيق تيار كهربائي 100 فولط على هلامة أغاروز 1% تحتوي على صبغة الإيتيديوم برومايد ضمن محلول TBE 1X (Trisbase، Boric acid، distilled water 1mM\1L EDTA) بالمقارنة مع مؤشر الوزن الجزيئي 1kb (Fermentas#SM0333) و100bp (Fermentas #SM0321). أُظهرت الحزم بالتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامات Gel Documentation System (ViLBER LourMAT) (Naman و Jallou، 2015).

استخلاص مشتقات الحموض الدهنية المفرزة من قبل البكتيريا

أُتبعت طريقة He (2015)، حيث أُخذ 15 مل من المعلق البكتيري السابق، وثفل بسرعة 8000 g لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة للتخلص من الخلايا البكتيرية، ثم نُقلت الرشاحة الطافية الخالية من الخلايا البكتيرية إلى أنبوب جديد، وضُبطت حموضة الوسط حتى pH=3-3.5 باستخدام HCl(6N)، ثم أُضيف حجم مماثل من خلات الايثيل إلى الرشاحة السابقة، ومُزجت محتويات الإنبوب لمدة 5 دقائق حتى تمام التجانس، ثم ثُفلت بسرعة 8000 g لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة، وجُمع المحلول العضوي الطافي (خلات الايثيل الحاوي على مشتقات الحموض الدهنية)، ونُقل إلى أنبوب جديد، ثم بُخّر على حمام مائي عند درجة حرارة 40°C، حتى تمام الجفاف، والحصول على المستخلص الخام (مشتقات الحموض الدهنية)، الذي حُفظ عند درجة حرارة -20°C لحين التحليل. أُخضعت مشتقات الحموض الدهنية المحفوظة على درجة حرارة -20°C إلى تحليل كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography Analysis (TLC) لتحديد عددها.

تحليل كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC:

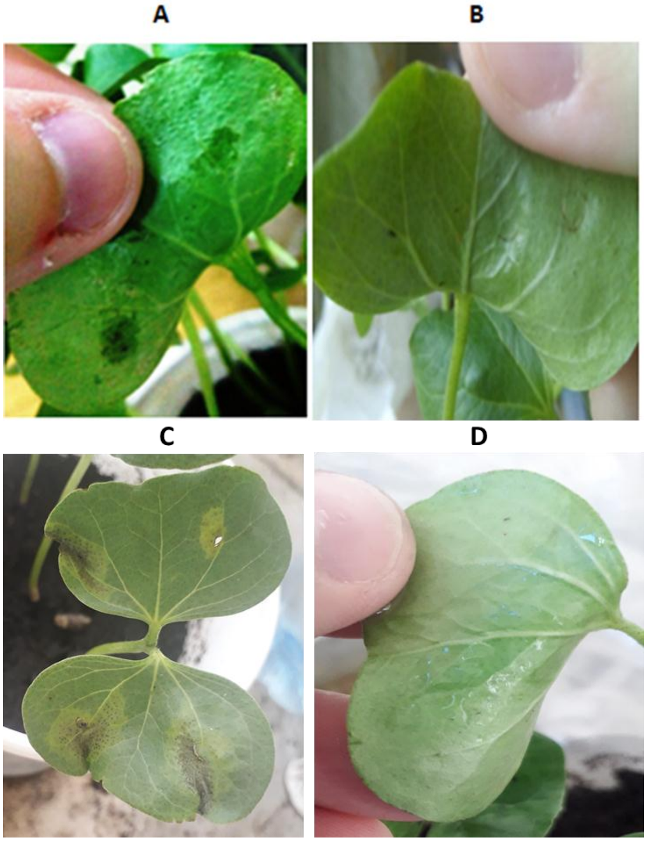
نُفذت هذه الطريقة حسب Almeida وزملائه (2012) مع بعض التعديلات البسيطة، حيث حُلّت مشتقات الحموض الدهنية المحفوظة على درجة حرارة -20°C في 50 µl من الميثانول النقي وبعد الرج السريع أخذ 25 µl من المستخلص الناتج، ووضعت على ألواح سيليكا جل من طراز (TLC plated silicagel 60 F 25 -4 pre-coated 20*20 cm, 0.25 cm layer thicknes, Merk, Germany)، واستخدم نظام هكسان/ميثانول 20:80 كطور متحرك، واستغرقت عملية الرحلان قرابة ساعتين

ونصف. أُظهرت مشتقات الحموض الدهنية بعدئذ بتعريض الألواح لبخار اليود النقي. وحُسِب معامل الاحتفاظ Retention Factor (RF) لكل بقعة بالعلاقة التالية: RF= المسافة التي تقطعها كل بقعة/ المسافة التي يقطعها محلول الطور المتحرك.

النتائج والمناقشة

القدرة الإمراضية للعزلة Xcm S101:

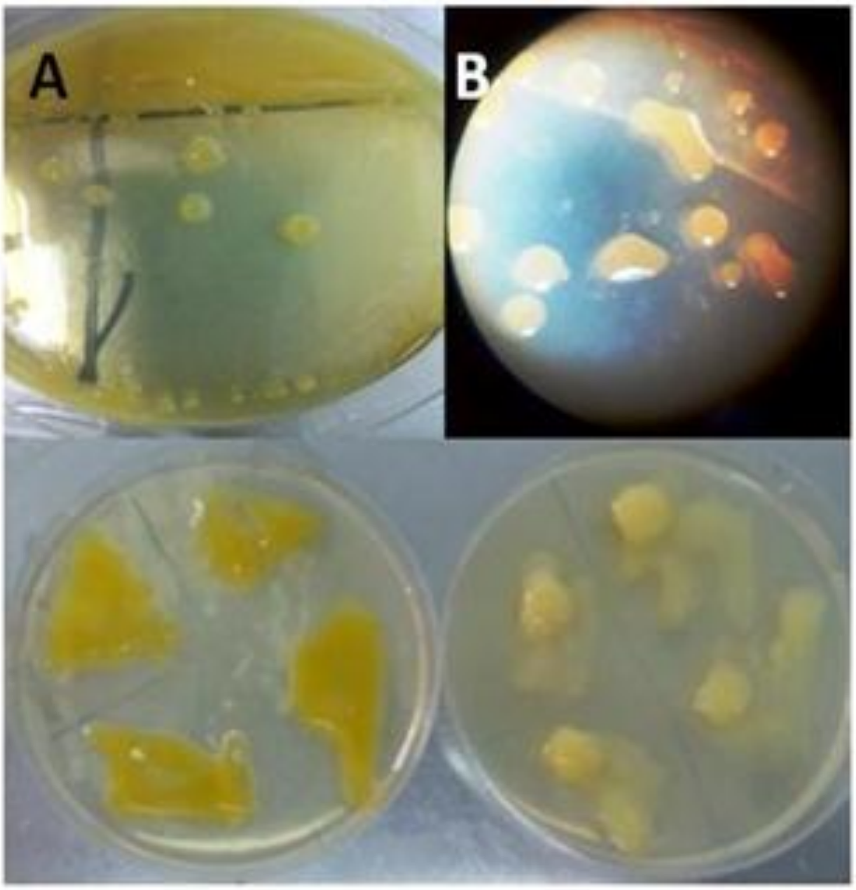
أجري اختبار القدرة الإمراضية على الأوراق الفلقية لنباتات القطن صنف حلب 33 من خلال حقن معلق بكتيري تركيزه 108 cfu / مل من العزلة البكتيرية Xcm S101g (المحفوظة بالغليسيرول 30 % على درجة حرارة -20°C) والعزلة Xcm S101p (المحفوظة تحت زيت البارافين عند درجة حرارة الغرفة) بهدف تنشيط القدرة الإمراضية للبكتيريا. بعد 96 ساعة من العدوى الاصطناعية (الشكل 1) ظهرت على السطح السفلي للأوراق الفلقية بقع زيتية مشبعة بالماء (Watersoaking) في مكان حقن المعلق البكتيري للعزلة Xcm S101g، بينما لم تظهر أي أعراض في مكان حقن المعلق البكتيري للعزلة Xcm S101p.



الشكل 1. (A) أعراض الإصابة بالعزلة Xcm S101g بعد 96 ساعة من العدوى بمعلق بكتيري تركيز cfu108/ مل (B) عدم ظهور الإصابة بالعزلة Xcm S101p بعد 96 ساعة من العدوى بمعلق بكتيري تركيز cfu108/ مل. (C): أعراض الإصابة بالعزلة Xcm S101g بعد 10 أيام من العدوى بمعلق بكتيري تركيز cfu108/ مل. (D): عدم ظهور الإصابة بالعزلة Xcm S101p بعد 10 أيام من العدوى بمعلق بكتيري تركيز cfu108/ مل.

ظهرت عند تنمية العزلتين البكتيريتين السابقتين على المستنبت YPGA مستعمرات العزلة Xcm S101g كما هو مبين في (الشكل 2-A) بعد 48 ساعة من الزرع بصفاتها النموذجية كمستعمرات دائرية صفراء اللون مخاطية، ذات حواف ناعمة محدبة، والموافقة لصفات البكتيريا التابعة لجنس *Xanthomonas* (Schaad وزملائه، 2001)؛ بينما تميزت العزلة Xcm S101p بلونها الأصفر الفاتح وإنتاجها العالي من عديدات السكر الخارجية EPS (الشكل 2-B)، وهذا ما يفسر فقدان مستعمراتها شكلها النموذجي، وعدم

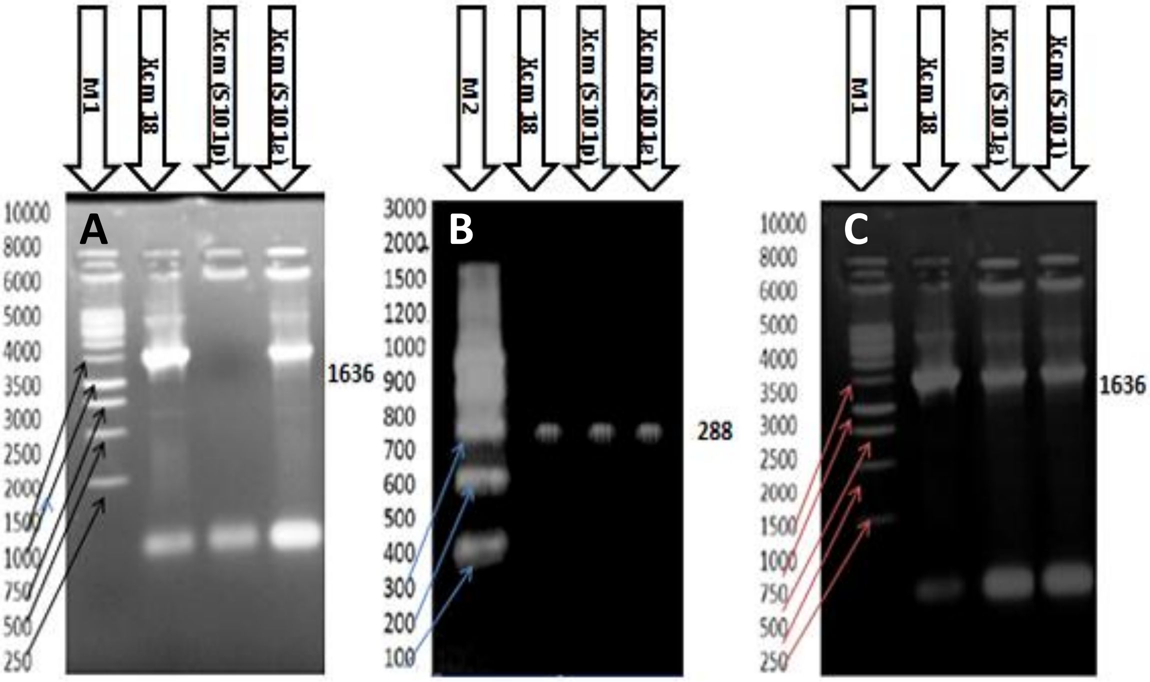
ظهور أعراض الإصابة بمرض اللفحة البكتيرية على الأوراق الفلقية لنباتات القطن صنف حلب 33 نتيجة الإنتاج الزائد من الـ EPS الذي يعمل على تحفيز ردود الفعل الدفاعية عند نبات القطن (Keshkeih وزملائه، 2019).



الشكل 2. المستعمرات البكتيرية بعد 48 ساعة من الزرع، (A) العزلة Xcm S101g، (B) العزلة Xcm S101p.

وللتأكد من هوية العزلتين البكتيريتين السابقتين أجري اختبار colony-PCR على المستعمرات البكتيرية بالمقارنة مع DNA السلالة النموذجية Xcm 18 باستخدام بادئات عامة تسمح بالكشف عن مورثة *Rpf* B عند البكتيريا التابعة لجنس *Xanthomonas*، والتي تسمح بتضخيم قطعة من المورثة *Rpf*B وزنها الجزيئي bp1636 (الشكل 3-A)، وبادئات متخصصة (راجع المواد وطرائق العمل) تسمح بالكشف عن قطعة صغيرة من هذه المورثة وزنها الجزيئي 288 bp عند البكتيريا Xcm (الشكل 3-B). أظهرت النتائج الموضحة في (الشكل 3-A) وجود الحزمة ذات الوزن الجزيئي 1636 bp في DNA الشاهد وفي العزلة Xcm S101g وغابت عند العزلة Xcm S101p، وكذلك بينت النتائج (الشكل 3-B) وجود الحزمة ذات الوزن الجزيئي 288 bp في DNA الشاهد وفي العزلتين Xcm S101g وXcm S101p المختبرتين. تؤكد هذه النتائج أنّ العزلتين البكتيريتين المدروستين تنتميان إلى البكتيريا Xcm، ولكن يبدو أن العزلة Xcm S101p قد تعرضت لطفرة في إحدى منطقتي ارتباط البادئات العامة. وهذا يفسر سبب عدم إمكانية تضخيمها في اختبار البادئات العامة والكشف عنها في اختبار البادئات المتخصصة مع الإشارة إلى أن البادئات المتخصصة تضخم قطعة من المورثة *Rpf* B تقع داخل القطعة المضخمة بواسطة البادئات العامة، وكانت العزلة Xcm S101p محفوظة بعدة نسخ تحت زيت البارافين وأجري اختبار colony-PCR على جميع النسخ المحفوظة وكانت النتيجة مشابهة لما ذكر (نتائج غير معروضة). أظهرت دراسات مرجعية أن البروتين الناتج عن المورثة *Rpf* B يؤدي إلى تفكيك DSF مما يؤدي إلى خفض إنتاج عديدات السكر الخارجية، هذا يعني إن عدم تعبير المورثة *Rpf* B سيؤدي إلى زيادة انتاج مشتقات الحموض الدهنية الحاوية على عائلة إشارة DSF، وبالتالي زيادة إنتاج عديدات السكر الخارجية EPS (Bi وزملائه، 2014). ولحسن الحظ أن الطفرة في المورثة *Rpf* B كانت في مكان ارتباط البادئات العامة لأن الطريقة المتبعة في التعريف لا تسمح لنا بالكشف عن الطفرات، إضافة إلى ذلك لا نستطيع أن نذكر أن هناك طفرات أخرى في جينوم العزلة Xcm S101p أو لا، ولكن نستطيع أن نؤكد أن هناك طفرة في المورثة *Rpf* B. ولتحديد نوع الطفرة في هذه المورثة نحتاج إلى عزل المورثة وتحديد التتابع النيكليوتيدي فيها، وإن فقدان القدرة الإمراضية لهذه العزلة قد يرتبط بطفرات أخرى في مورثات القدرة الإمراضية. والعزلة البكتيرية Xcm S101g والتي طورت أعراض مرض

اللفحة البكتيرية تم إعـــــادة عزلها من الأنسجة النباتية المُعداة بسـبب احتفـــــاظها للقدرة الإمراضية وإعادة تعريفـــــــها باختبار colony-PCR وسميت بـ Xcm S101 (الشكل 3-C).

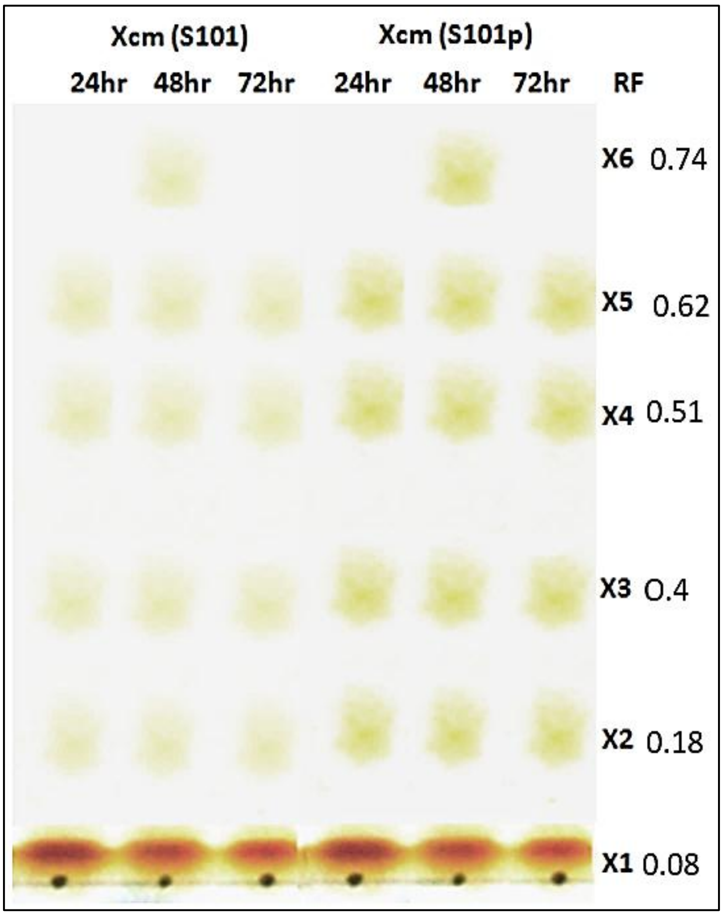


الشكل 3. نواتج تفاعل الـ colony-PCR للعزلات Xcm (S101،S101p،S101g) على هلامة الأغاروز (1%) ضمن محلول الرحلان الكهربائي TBE (1 X).(A) باستخدام زوج البادئات RpfB1، (B) باستخدام زوج البادئات RpfB2، (C) العزلة Xcm S101g قبل وبعد العدوى الاصطناعية والتي سميت بـ Xcm S101 باستخدام زوج البادئات RpfB1، M1 مؤشر جزيئي kb1، M2 مؤشر جزيئي 100 bp.

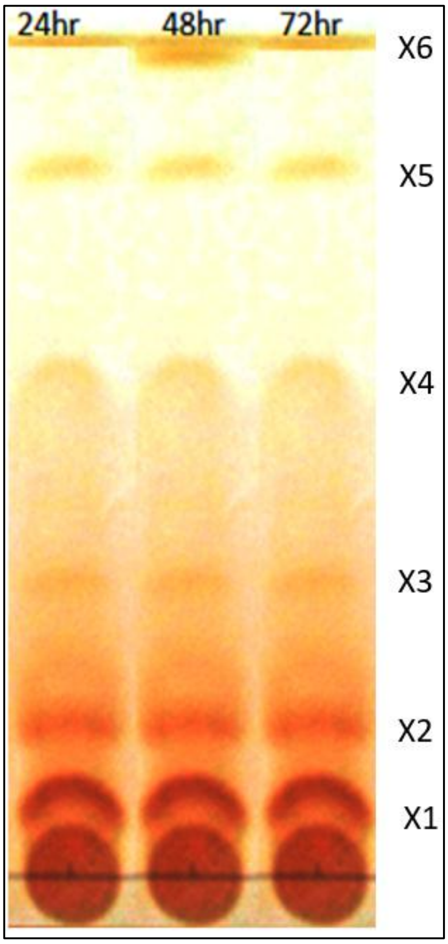
الكشف عن مشتقات الحموض الدهنية الحاوية على DSF على أطباق TLC:

نُميت العزلتان البكتيريتان Xcm S101 وXcm S101p في المستنبت NYG، ثم استخلصت مشتقات الحموض الدهنية بعد 24، 48، 72 ساعة من الزرع. طبّق 25 µl من الخلاصات على أطباق **TLC** ثم كُشف عن مشتقات الحموض الدهنية حسب ما ورد في المواد والطرائق. أظهرت نتائج الرحلان على أطباق TLC والموضحة في (الشكل 4) وجود 5 بقع (X1، X2، X3، X4، X5) في العينات المحضّنة مدة 24، و72 ساعة، و6 بقع (X1، X2، X3، X4، X5، X6) في العينات المحضّنة مدة 48 ساعة، وكان عامل الاحتفاظ RF على الشكل التالي 0.08، 0.18، 0.4، 0.51، 0.62، 0.74 للبقع X1، X2، X3، X4، X5، X6 على التوالي. أظهرت النتائج كثافة عالية للبقع في العزلة Xcm S101p مقارنة مع العزلة Xcm S101 في كل الأزمنة المدروسة، هذه النتيجة تؤكد ما ذكر في الدراسات المرجعية أنّ الطفرة في المورثة *Rpf* B تؤدي إلى زيادة في إفراز مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة ومن ضمنها الـ DSF (Ryan وزملائه، 2016)، وكذلك استخدم وسط النمو NB في تنمية العزلة البكتيرية Xcm S101، وكُشف عن مشتقات الحموض الدهنية في الوسط بعد 24، 48، 72 ساعة من الزرع، فأعطت نتائج مشابه لما تم الحصول عليه في وسط النمو NYG (الشكل 5).

أكّد He وزملائه (2011) في دراسته لمشتقات الـ DSF عند Xoo على وجود 4 بقع على أطباق TLC، بينما أكد Amelidia (2012) في دراسته لمشتقات الـ DSF عند البكتيريا *Xylella fastidiosa* و Xcc على وجود ثلاثة بقع على أطباق الـ TLC للعزلات غير الطافرة لكل منهما وبقعتين على أطباق الـ TLC للعزلات الطافرة في المورثة *Rpf* B، ولكن وجد أن تركيز البقع الناتجة عن العزلات الطافرة في المورثة *Rpf* B أعلى تركيزاً من البقع الناتجة عن العزلات غير الطافرة. كما أشار Ryan وزملائه (2016) أن حدوث طفرة في المورثة *Rpf* B عند البكتيريا Xcc وXoo يؤدي إلى زيادة تشكل مشتقات الحموض الدهنية غير المشبعة بما فيها عائلة الـ DSF.



الشكل 4. تحليل TLC يظهر وجود بقع بنية اللون -بعد تصبغها باليود - لمشتقات الحموض الدهنية المفرزة من قبل العزلتين Xcm S101 و Xcm S101p إلى الوسط NYG.



الشكل 5. تحليل TLC يظهر وجود بقع بنية اللون - بعد تصبغها باليود - لمشتقات الحموض الدهنية المفرزة من قبل العزلة Xcm S101 إلى الوسط NB.

الاستنتاجات والتوصيات

1. الزمن الأمثل لاستخلاص مشتقات الحموض الدهنية الحاوية على جزيئات DSF هو 48 ساعة بعد تلقيح وسط الزرع السائل.
2. حدوث طفرة في المورثة *RpfB* في البكتيريا Xcm S101 المحفوظة تحت زيت البارافين عند درجة حرارة الغرفة، مما أفقدها قدرتها الإمراضية على بادرات القطن.
3. تميزت العزلة الطافرة بإنتاج عالٍ لمشتقات الحموض الدهنية الحاوية على DSF مقارنة مع العزلة النموزجية كما ظهر من خلال التحليل بتقانة TLC، وكذلك بإنتاجها العالي لعديدات السكر الخارجية، إضافة لذلك فقدانها لقدرتها الإمراضية.
4. إجراء تحليل للمشتقات الحموض الدهنية بطريقة GC-MS و LC-MS لتحديد البصمة الكيميائية للجزيئات الموجودة في مستخلص خلات الإيثيل عند الزمن 48 ساعة من التلقيح.

المراجع

- Almeida, R.P., N, Killiny., K.L, Newman., S, Chatterjee., M, Ionescu., and S.E, Lindow. (2012). Contribution of rpfB to cell-to-cell signal synthesis, virulence, and vector transmission of Xylella fasdiosa. Mol Plant Microbe Interact 25, 453-62.
- Barber,C.E., J.L,Tang., J.X,Feng., M.Q,Pan., T.J,Wilson., H, Slater., J.M,Dow., P, Williams and M.J, Daniels. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of Xanthomonas campestris is mediumsted by a small diffusible signal molecule. Mol. Microbiol 24, 555-66.
- Bi, H., H, Dong., and J.E, Cronan.(2014). Xanthomonas campestris RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase. Mol.Microbiol. pp.262-75.
- 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.
- Deng,Y., J,Wu., W,Yin., P,Li., J,Zhou., S,Chen., F,He., J,Cai., and L,Zhang.(2016). Diffusi ble signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition. Environ Microbiol 18 (5) :1534-45. doi: 10.1111/1 462-2920.13244.
- Guo, Yi., Zhang, Ya., Liang, Ji., and Wang, Ni.(2012). Diffusible Signal Factor- Medaited Quorum Sensing Plays a Central Role in Coordinating Gene Expression of Xanthomonas citri subsp. citri. The American Phytopathological Society. dx.doi.org/10.1094.
- Keshkeih, R., Abu-Ghorrah, M., Jalloul, A. (2019). Exopolysaccarides from xanthomonas citri pv. malvacearum induce in cotton against bacteria blight. Biotechnology vol.100 (2) c pp. 101-109 C 2019.
- Martinez, C., Montillet JL, Bresson E, Agnel JP, Daï GH, Daniel JF, Geiger JP, Nicole M. Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to Xanthomonas campestris pv. malvacearumrace 18. Mol Plant-Microbe Interact. 1998;11:1038–1047
- Naman,R., Jalloul, A .(2015).Quorum sensing in *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*. Mater thesis. Damascus University.
- Oliveira,J.C.,G.M.R, Albuquerque., E.B, Souza.(2011).Characterization of *Xanthom-onas citri* subsp. *malvacearum* causing cotton angular leaf spot in Brazil. Journal Of Plant Pathology 93(3):707-712.
- Qian, G., Zhou, Yi., Zhao, Ya., Song, Zh., Wang, Su., Fan, J., Hu, Ba., and Liu., Fe. (2013). Proteomic analysis reveals novel extracellular virulence- Associated proteins and functions regulated by the Diffusible Signal Factor (DSF) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Journal of proteome research. American Chemical Society. Doi.org /10.1021/pe4001543].
- 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.

- Robert, P. R .,and J. Maxwell.(2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. Cell press. doi:10.1016/j.tim.2010.12.003.
- Ryan, R. P., and J. M, Dow. (2011). Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. Trends Microbiol. 19, 145–152.
- Ryan, R.P., S.Q, An., J, Allan., Y, McCarthy., and J.M, Dow. (2015). The DSF family of Cell-Cell Signals: An Exapanding Class of Bacterial Virulance Regulators. POLS.ppat.1004986.
- Ryan, R.P., M, Dow., L.M. Naughton., B, Hollmann., and S.Q, An.(2016). The Diffusible Signal Factor of Bacterial Cell-Cell Signls.Palestine Journal of Chemistry. VOL.3. PP121-130.
- Rigano, L.A, C,Payette., G,Brouillard., M.R,Marano., L,Abramowicz., 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.
- Schaad, N.W., J.B,Jones., and G.H,Lacy. (2001). *Xanthomonas*. In: *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition (Eds. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W.). APS Press, St. Paul Minnesota.
- Smith, EF. (1901). The culture characters of Pseudomonas hyacinth, Ps campestri, Ps. Pgaseoli and Ps. Stewarti. Four one flagellate yellow bacteria parasitic on plants. US. Dept. Agr. Div. Veg. Pathol. Bull, 28;1-153.
- Waters, C.M., and B.L,Bassler.(2005).Quorum Sensing Cell-to-Cell Communication in Bacteria. Molecular Biology.p21:319–46
- 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.
- Zhou, L., L.H,Zhang., M,Cámara., and Y.W,He. (2016). The DSF Family of Quorum Sensing Signals :Diversity, Biosynthesis, andTurnover.Cell press.Review.

N° Ref: 952