

" تأثير إشارات التواصل البكتيري من عائلة الـ DSF على بعض عوامل الشراسة عند بكتيريا التبقع الزاوي *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* على القطن. "

علي محمد يونس¹، أ.د. محمود حسن أبوغرة²، أ.د. منال نزار داغستاني³

1 طالب دكتوراه في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة - جامعة دمشق.
ali.younes@damascusuniversity.edu.sy

2 أستاذ في قسم وقاية النبات - كلية الزراعة - جامعة دمشق.

3 أستاذ مساعد في قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة دمشق.

الملخص:

تعتمد بكتيريا جنس *Xanthomonas* على إشارات عائلة DSF-family (Diffusible Signal Factor-family) لتتوسط عندها نظام الاستشعار عن النصاب العددي Quorum Sensing (QS)، والذي يتحكم بتعبير مورثات القدرة الإراضية للجنس *Xanthomonas* بالاعتماد على الكثافة العددية للبكتيريا في الوسط، لذلك هدف البحث إلى دراسة تأثير التراكيز المختلفة لكل من خلاصة وسط زرع البكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* S101 (Xcm S101) الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF mg/mL (0.25، 0.5، 1.25، 7.5) و μM (10، 50، 100) من الإشارة النقية DSF على بعض عوامل الشراسة عند البكتيريا Xcm S101. أظهرت النتائج أن كلاً من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF تلعب دوراً سلبياً في قدرة البكتيريا على التعبير عن عوامل القدرة الإراضية، حيث سبب التركيز 0.25 mg/mL من الخلاصة البكتيرية والتركيز 10 μM من الإشارة النقية DSF في تخفيض نمو البكتيريا مقارنة مع الشاهد بمعدل (1.8، 1.26) لوغاريتمياً على التوالي بعد 48 ساعة من التحضين، أما التراكيز العالية (1.25، 7.5) mg/mL من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة DSF والتراكيز (50، 100) μM من الإشارة النقية DSF فقد سببت في موت البكتيريا بعد (3، 0؛ 72، 24) ساعة على التوالي، كما سببت كلاً من الخلاصة البكتيرية والإشارة النقية DSF بتراكيز (0.25 mg/mL، 10 μM) على التوالي انخفاضاً في حركة البكتيريا في الوسط بمعدل (51، 78)% على التوالي مقارنة مع الشاهد، أما التراكيز العالية من الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية DSF (0.5 mg/mL، 50 μM) على التوالي

تاريخ الإيداع: 2022/2/9

تاريخ القبول: 2022/4/6



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص CC

BY-NC-SA 04

فقد سببت في تثبيط حركة البكتيريا في الوسط، كما سبب الخلاصة البكتيرية في تخفيض كل من كمية إنتاج السكريات المعقدة الخارجية EPS بالتركيز (0.25، 0.5، 1.25) بعد 24 ساعة من التحضين في الوسط NB بمعدل (20.5، 38.6، 73.5) % على التوالي، وإنتاج البروتيناز بعد 48 ساعة من التحضين بمعدل (33.4، 61، 100) % على التوالي، وأظهرت كلا من الخلاصة الموافقة للتركيز (0.25، 0.5، 1.25) انخفاضاً في تشكل البيوفيلم بمعدل (31.6، 60، 70) % على التوالي، وانخفاضه عند استخدام الإشارة النقية DSF بتركيز μM (10، 50) بمعدل (63.5، 68.9) % على التوالي.

الكلمات المفتاحية: Dsf، Qs، Xcm S101، بروتيناز، حركة، السكريات المعقدة الخارجية، بيوفيلم.

"Effect of bacterial communication signals of DSF family on some virulence factors of bacterial angular spot *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* on the cotton"

Ali Mohamad Younes¹

Pro. Mahmoud Hasan Abogurrah²

Pro. Manal Nezar Daghestani³

¹Ph.D student at Plant Protection department, Faculty of Agriculture , Damascus university.

²Professor at at Plant Protection department, Faculty of Agriculture, Damascus university.

³Teacher Assistant at Chemistry Department, Faculty of Science, Damascus university.

Abstract:

The bacteria, *Xanthomonas* spp depend on the Diffusible Signal Factor-family-DSF-family- to mediate their Quorum Sensing (QS) system, which controls the expression of the pathogenicity genes of the genus *Xanthomonas*, depending on the density of bacteria in the medium. Effect of different concentrations of DSF-family-containing extract of culture of the bacterial *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* S101 (0.25, 0.5, 1.25, 7.5) mg/mL and (10, 50) μ M of DSF pure signal on some virulence factors in Xcm S101 bacteria. The results showed that both DSF-family-containing extract of culture of Xcm S101 and DSF pure signal play a negative function on the ability of bacteria to express pathogenicity factors, as the concentration of 0.25 mg/mL of the bacterial extract witch containing DSF-family and the concentration of 10 μ M of DSF pure signal caused a reduction in bacterial growth Compared with the control logarithmically (1.8, 1.26) after 48 hours of incubation, while high concentrations (1.25, 7.5) mg/mL of bacterial extract- containing DSF-family and concentrations (50, 100) μ M of DSF pure signal caused the death of bacteria after (3,0;72,24) hours respectively. Incubation the bacterial extract containing DSF-family and DSF pure signal with concentrations (0.25 mg/mL, 10 μ M), respectively, caused a decrease in the movement of bacteria in the medium by an average of (51, 78) % respectively compared to the control. while high concentrations of the bacterial extract or the pure DSF signal (0.5 mg/mL, 50 μ M), respectively, caused inhibition of bacteria movement in the medium, and the bacterial extract reduced the production of EPS (0.25, 0.5, 1.25) respectively after 24 hours of incubation in NB medium. At a rate of (20.5, 38.6, 73.5) % respectively and production of proteases after d 48 hours of incubation at a rate of (33.4, 61, 100) %, as all extracts with concentrations (0.25, 0.5, 1.25) caused a reduction in biofilm formation at a rate of (31.6, 60, 70)% respectively, and its reduction when using the pure DSF signal at concentrations (10, 50) μ M at a rate of (63.5, 68.9)% respectively.

Keywords: Dsf, Qs, Xcm S101, Proteases, Motility, Exopolysaccharides, Biofilm.

Received: 9/2/2022

Accepted: 6/4/2022



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

المقدمة Introduction:

تعتمد البكتيريا في تنسيق تعبيرها الجيني على الكثافة العددية للخلايا البكتيرية في الوسط الذي تعيش فيه، وهي ظاهرة يشار إليها عادة بالاستشعار عن النصاب العددي (Quorum Sensing (QS)؛ والذي يتضمن إنتاج وإفراز واستقبال جزيئات إشارة كيميائية صغيرة الحجم قابلة للانتشار في الوسط المحيط وتسمى بالمرضات الذاتية (Autoinducers)، حيث تستجيب الخلايا البكتيرية لهذه الإشارات عندما يكون يصل تركيزها إلى عتبة معينة، وبناء عليها يتم تنشيط أو قمع التعبير عن المورثات المستهدفة (Schmid وآخرون، 2012، 4)، ومن أهم أنواع الإشارات البكتيرية التي تتوسط العديد من الأنواع البكتيرية سالبة الغرام بما فيها جنس *Xanthomonas* عائلة عامل الإشارة المنحل DSF (Wang وآخرون، 2004، 2)، أشارت الدراسات المرجعية إلى أن إشارات عائلة الـ DSF تتكون من مشتقات حموض دهنية غير مشبعة ذو وضعية المقرون Cis والرابطة المزدوجة بين ذرة الكربون الثانية والثالثة، وتُصنع من الكربوهيدرات والحموض الأمينية متفرعة السلسلة عبر دورة استطالة الحمص الدهني FAS (Zhou وآخرون، 2015، 6)، وتختلف إشارات عائلة الـ DSF عن بعضها البعض في طول سلسلة الكربون، وتموضع مجموعة الميثيل، والتشعب (Wang وآخرون، 2004، 4)، وأشارت الدراسات السابقة إلى أن الـ QS عند جنس *Xanthomonas* يقوم بالسماح للخلايا البكتيرية بالتعرف على الأنواع الأخرى الموجودة حولها وفي التحكم بكثافتها العددية، وقدرتها الإراضية من خلال تنسيق إنتاج وإفراز واستقبال الإشارات البكتيرية.

حيث يسمح الـ QS بتنظيم تعبير مورثات القدرة الإراضية كاستعمار أسطح الكائنات الحية وغير الحية والأنزيمات الخلوية الخارجية كالبروتياز Protease، والسيلولاز Cellulase، والحركة، والنمو، وعديدات السكر الخارجية (EPS)، والبيوفيلم (Biofilm) عند البكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Barber وآخرون، 1997؛ Rigano وآخرون، 2007، 4) وعند البكتيريا *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) و *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Qian وآخرون، 2013، 5؛ Rai وآخرون، 2015، 4)، وغيرها من عوامل القدرة الإراضية كمقاومة المضادات الحيوية والتأقلم مع الوسط المحيط (Deng وآخرون، 2016، 3). ويرمز لإنتاج وإفراز عائلة الـ DSF قطعة من الـ DNA وزنها الجزيئي (21.9 kd) وتسمى بـ *Regulation of Pathogenicity Factors (rpf)*، وتضم تسلسل مورثات *rpf* ABCDEFGHI (Barber وآخرون، 1997، 4). وحددت وظائفها عند البكتيريا Xcc و Xoo من خلال إجراء طفرات بـ Transposon mutagenesis، حيث المورثة *RpfF* ترمز للبروتين *RpfF* الأنزيم الرئيس في إنتاج عائلة الإشارة DSF، الذي يملك وظيفتي Acyl-ACP-thioesterase و Dehydratase (Zhou وآخرون، 2015، 5)، والمورثة *Rpf B* ترمز للأنزيم Fatty acyl-CoA-ligase الذي يلعب دور في حركية الحموض الدهنية الحرة المشبعة المُشكلة من قبل الفعالية الأنزيمية Thioesterase للـ *RpfF*، وقد بينت الدراسات أن له دور في تفكيك إشارات عائلة الـ DSF، حيث عند حذف المورثة *Rpf B* أو إحداث طفرة فيها يؤدي إلى زيادة مستوى الـ DSF في معلق زرع البكتيريا Xcc (Zhou وآخرون، 2016، 4)، بينما المورثتين *Rpf C* و *Rpf G* يشكلان نظام استقبال ونقل جزيئات عائلة الـ DSF (Robert و Maxwell، 2011، 3؛ Ryan وآخرون، 2011؛ Ryan وآخرون، 2015، 4)، ومن أخطر الأنواع البكتيرية التابعة للجنس *Xanthomonas* بكتيريا التبغ الزاوي على الفطن *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm)، حيث بين يونس وآخرون (2018) أنها تفرز سبع مشتقات حمضية جزيئية تابعة لعائلة الـ DSF والتي تتوسط الـ QS عندها وهي 2-cis-hexadecenoic acid و cis-2-undecenoic acid و 11-methyldodecanoic acid و cis-11-methyl-2-dodecanoic acid

(DSF) و-2,5-dienoic acid cis-11-methyldodeca (CDSF) و cis-2-dodecenoic acid (BDSF) و-12-methylte tradecanoic acid وتعتبر البكتيريا Xcm من أخطر المسببات المرضية التي تصيب محصول القطن حيث تهاجم معظم أجزاء النباتات وفي مختلف مراحل النمو (Jalloul وآخرون، 2015).

هدف البحث :Research objective

انطلاقاً من أهمية دراسة الاستشعار عن النصاب العددي (Quorum sensing) عند البكتيريا، ودورها في التحكم بعوامل القدرة الإراضية، هدف البحث إلى دراسة تأثير كلاً من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF على بعض عوامل القدرة الإراضية للبكتيريا Xcm S101 مخبرياً.

مواد البحث وطرائقه :Methods and Materials

مكان تنفيذ البحث:

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

العزلة البكتيرية وأوساط النمو:

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

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

أستخلصت جزيئات عائلة الـ DSF من وسط زرع البكتيريا Xcm S101، حيث أتبعنا طريقة Zhou وآخرون (2017، 4) مع بعض التعديلات التي أجراها يونس وآخرون (2018)، حيث نمت العزلة البكتيرية Xcm S101 على وسط الزرع NA، وحُضِنَت عند درجة حرارة 28°C لمدة 48 ساعة، ثم أُخذت مستعمرة بكتيرية واحدة ولُقِّحت في 40 mL من الوسط NB، وحُضِنَت مع الرِّج على سرعة 200 دورة / دقيقة ودرجة حرارة 28°C لمدة 48 ساعة، حتى وصول تركيز المعلق البكتيري إلى كثافة ضوئية مساوية لـ 1، ثم أُخذ 20 mL من الوسط السابق وُزِع في 1000 mL من نفس الوسط السابق ضمن وعاء مخروطي، وحُضِنَت بنفس الشروط السابقة مدة 48 ساعة، حتى أصبح تركيز البكتيريا في المعلق ثلاثة أضعاف التركيز السابق، ثم نُقل المعلق البكتيري السابق بسرعة 8000 xg لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة للتخلص من الخلايا البكتيرية، ثم نُقلت الرشاحة الطافية الخالية من الخلايا البكتيرية إلى أوعية مخروطية جديدة، وضُبطت حموضة الوسط حتى أصبحت pH=3.5-3 باستخدام 6N (HCl)، ثم أُضيف حجم مماثل من خلات الايثيل إلى الرشاحة السابقة، ومُزجت محتويات الأوعية السابقة لمدة 15 دقائق في الحاضنة الرجاجة عند درجة حرارة 28 °C حتى تمام التجانس، ثم نُقلت بسرعة 8000 xg لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة، وُجِع المعلق العضوي الطافي (خلات الايثيل الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF)، ونُقل إلى وعاء مخروطي

جديد، ثم بخرت خلاصات الإيثيل بواسطة حمام مائي عند درجة حرارة 40 °C، حتى تمام الجفاف، ثم حُفظت خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF عند درجة حرارة -20 °C لحين الاستخدام.

تحضير الإشارة النقية DSF و خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF للتجارب:

اتبعت طريقة (Kakkar وآخرون، 2015، 8)، حيث حُضرت الإشارة النقية الـ DSF (Sigma 90% ≤) بتركيز 1 mM و خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز 20 mg/mL بواسطة 20% ميثانول Methanol في ماء مقطر كتركيز أساسية، ثم مددت بالماء المقطر أو بالبيئة NB حسب التجربة المستخدمة حتى الحصول على التركيز المطلوبة، ويُضاف إلى الشاهد لكل تجربة أيضاً 1% ميثانول.

تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على النمو والبقاء:

أُتبعَت طريقة Wiegand وآخرون (2008، 6) مع بعض التعديلات. حيث حُضرت 10 أنابيب زجاجية 5 منها احتوت على 5 mL من الوسط المغذي والـ 5 الأخرى احتوت على 5 mL من الوسط غير المغذي، احتوت 4 أنابيب من كل وسط على تراكيز مختلفة من الخلاصة البكتيرية (0.25، 0.5، 1.25، 7.5) mg/mL، والباقي لم تحتوي كشاهد، أُضيفت إلى الأنابيب الـ 10 السابقة 20 µL من معلق بكتيري كثيف ذو كثافة ضوئية مساوياً لـ 1 (OD₆₀₀=1) تقريباً (2~*10⁹ CFU/mL)، ثم حُضنت الأنابيب الزجاجية الحاوية على الوسط غير المغذي عند درجة حرارة 4°C والأنابيب الزجاجية الحاوية على الوسط المغذي ضمن الحاضنة الرجاجة عند درجة حرارة 28°C وسرعة 200 دورة/دقيقة لمدة (0، 3، 6، 24، 48، 72) ساعة، دُرست خلال هذه الفترات تأثير الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا على النمو في الوسط المغذي والبقاء في الوسط غير المغذي من خلال إجراء تعداد بكتيري بعد إجراء تمديدات مختلفة (10⁻¹، 10⁻²، 10⁻³،، 10⁻⁸)، ثم أُخذ 10 µL من كل أنبوب ووضعها على أطباق NA، وللتأكد من أن إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط الزرع البكتيري Xcm S101 هي المسؤولة عن تنظيم نمو البكتيريا Xcm S101 في الوسط المغذي والبقاء في الوسط غير المغذي، أُعيدت التجربة باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة (10 µM، 50 µM، 100 µM) من الإشارة النقية الـ DSF (Sigma 90% ≤) بالإضافة إلى التركيز 0.5 mg/mL و 1.25 mg/mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF كشاهد ثاني، واتبعت الخطوات السابقة نفسها من حيث طريقة تحضير الأنابيب والتحصين وشروطه.

تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على الحركة:

حُضر معلق بكتيري ذو كثافة ضوئية مساوياً لـ 0.3 (OD₆₀₀=0.3) تقريباً (6~*10⁸ CFU/mL)، أُخذ منها 3 µL تقريباً، ووضعت في منتصف أطباق بتري حاوي على وسط (Agar 0.3% + NB) مُضاف إليها مُسبقاً تراكيز مختلفة من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (0.25، 0.5، 1.25) mg/mL بمعدل 3 مكررات لكل تركيز بالإضافة إلى الشاهد الذي لم يصف إليه أي تركيز، حسب طريقة An و Tang (2018، 7)، ثم حُضنت الأطباق السابقة عند درجة حرارة 28°C لمدة (24، 48، 72، 96) ساعة، ودُرست خلالها خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تنظيم قدرة البكتيريا على الحركة من خلال قياس قطر انتشار البكتيريا في الوسط، وذلك مقارنة مع الشاهد، وللتأكد أن إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm هي المتحكمة في تنظيم حركة البكتيريا Xcm S101 في الوسط الغذائي، أُعيدت التجربة باستخدام التركيزين 10، 50 µM من الإشارة النقية الـ DSF (Sigma 90% ≤) بالإضافة إلى استخدام التركيز

0.5 mg/mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF كشاهد ثاني، واتبعت الخطوات السابقة نفسها من حيث تحضير الأنابيب والأطباق والتحصين وشروطه.

تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على إنتاج أنزيم البروتياز:

أُتبعَت طريقة (Wang وآخرون، 2004، 4؛ Fouhy وآخرون، 2007، 3) مع بعض التعديلات، حيث حُضرت 4 أنابيب زجاجية احتوت على 3 mL من البيئة المغذية NB، أُضيف إلى 3 منها 1 mL من تراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF، والأنبوب الرابع أُضيف له 1 mL من البيئة NB كشاهد، ثم أُضيف إلى الأنابيب الأربعة السابقة 1 mL من معلق بكتيري كثيف، حتى أصبح التركيز النهائي للمعلق البكتيري في كل إنبوب مساوياً لـ 0.6 (OD₆₀₀=0.6) تقريباً (CFU/mL ~10⁸⁻⁹)، وتركيز الخلاصة البكتيرية في 3 أنابيب منها [(0.25، 0.5، 1.25) mg/mL]، والرابع لم يحتوي على أي تركيز كشاهد، حُضنت الأنابيب السابقة عند الدرجة 28°C مع الرج على سرعة 200 دورة/دقيقة لمدة 4 ساعات، أُخذ 5 µL من المعلق السابقة، ووضعت على أطباق NA مزودة بـ 1% حليب منزوع الدسم، وحُضنت الأطباق السابقة عند درجة حرارة 28 °C لمدة (24، 48، 72، 96، 120) ساعة، وقيست الفعالية الأنزيمية بقياس قطر الهالة الشفافة المحيطة بالطلاخة البكتيرية، وذلك بالاعتماد على قدرة هذا الأنزيم على تفكيك بروتين الحليب.

تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على إنتاج السكريات المعقدة الخارجية:

أُتبعَت طريقة He وآخرون (2010، 6)، حيث حُضرت معلق بكتيري من العزلة البكتيرية Xcm S101 بحجم 1 mL وبكثافة ضوئية مساوياً لـ 1 (OD₆₀₀=1) تقريباً (CFU/mL (10⁹*2)، أُخذ منها 800 µL من المعلق السابق، ووزعت بالتساوي ضمن 8 أنابيب زجاجية، 4 أنابيب منها حاوية على 5 mL من البيئة السائلة NB التي تعطي إنتاجاً عالياً من إشارات عائلة الـ DSF، 3 منها احتوت على تراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF [(0.25، 0.5، 1.25) mg/mL]، والرابع لم يحتوي على أي تركيز كشاهد، و4 أنابيب زجاجية حاوية على 5 mL من البيئة السائلة XLON (0.07% K₂HPO₄، 0.02% KH₂PO₄، 0.1% (NH₄)₂SO₄، 0.01% MgCl₂، 0.001% FeSO₄، 0.0001% MnCl₂، 0.2% Sucrose، 0.0625% Trypton، 0.0625% Yeast Extract]، والتي تعطي إنتاجاً منخفضاً من إشارات عائلة الـ DSF، 3 منها احتوت على تراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF [(0.25، 0.5، 1.25) mg/mL] والرابع لم يحتوي على أي تركيز كشاهد، حُضنت الأنابيب السابقة عند درجة حرارة 28°C وسرعة 200 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة، ثم نُقلت المعلقات البكتيرية السابقة للتخلص من الخلايا البكتيرية، وأُضيف إلى الرشاحات البكتيرية الناتجة كلور البوتاسيوم بتركيز نهائي 1% (v/w)، وحجمين من الإيثانول المطلق إلى الرشاحة البكتيرية، وحُفظ الخليط السابق عند الدرجة -20°C طول الليل، ثم رسبت السكريات المعقدة الخارجية بالتثقيب عند سرعة 10000 xg لمدة 10 دقائق عند الدرجة 4°C، وحسبت كمية الـ EPS المنتجة بتجفيف العينات السابقة عند الدرجة 55°C لمدة 24 ساعة ثم حُسبت الأوزان.

تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF في تشكّل الـ

:Biofilm

أُتبعَت طريقة (Deng وآخرون 2014، 5؛ Cai وآخرون 2017، 7) مع بعض التعديلات، حيث حُضرت 4 أنابيب زجاجية احتوت على 3 mL من البيئة المغذية NB، أُضيف إلى 3 منها 1 mL من تراكيز مختلفة من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm

الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF، والأنبوب الرابع أُضيف له 1 mL من البيئة NB كمشاهد، ثم أُضيف إلى الأنابيب الأربعة السابقة 1 mL من معلق بكتيري ذو كثافة ضوئية مساوياً لـ 0.05 ($OD_{600}=0.05$)، حتى أصبح التركيز النهائي للمعلق البكتيري في كل إنبوب مساوياً للـ 0.01 ($OD_{600}=0.01$)، وتركيز الخلاصة البكتيرية في 3 أنابيب منها (0.25، 0.5، 1.25) mg/mL، والرابع لم يحتوي على أي تركيز كمشاهد، حُصنت الأنابيب السابقة عند الدرجة 28°C مع الرج على سرعة 200 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة حتى وصول الكثافة الضوئية للمشاهد لـ 0.1 ($OD_{600}=0.1$)، وُزعت محتويات الأنابيب السابقة ضمن لوح (96 خلية) من بولي ستيرين Polystyrene، بمعدل 200 µL في كل خلية، ثم حُصن اللوح (96 خلية) عند درجة حرارة 28°C وسرعة 150 دورة/دقيقة لمدة 24 ساعة، ثم أُزيلت محتويات اللوح السابق بهدوء، وصُبغت بواسطة 200 µL من الكريستال البنفسجي (1% لمدة 20 دقيقة، ثم غُسلت خلايا اللوح بالماء المقطر وجُففت، وأخذت الصور المناسبة، وحُدثت كمية الـ Biofilm بإضافة 200 µL من الإيثانول (95%) إلى خلايا اللوح السابق لكي يحل الـ Biofilm (الذي تحول إلى اللون الأزرق)، أُخذ محتويات 5 خلايا والتي تعادل (1 mL)، وقيست امتصاصيته على طول الموجة OD_{590} ، وللتأكد من أن إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm هي المتحكم في تشكيل الـ Biofilm، أعيدت التجربة باستخدام التركيزين (10، 50) µM من الإشارة النقية الـ DSF ($\leq 90\%$ Sigma) بالإضافة إلى التركيز 0.5 mg/mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF كمشاهد ثاني، واتبعت الخطوات السابقة نفسها من حيث تحضير الأنابيب واللوح والتحصين وشروطه.

التحليل الإحصائي:

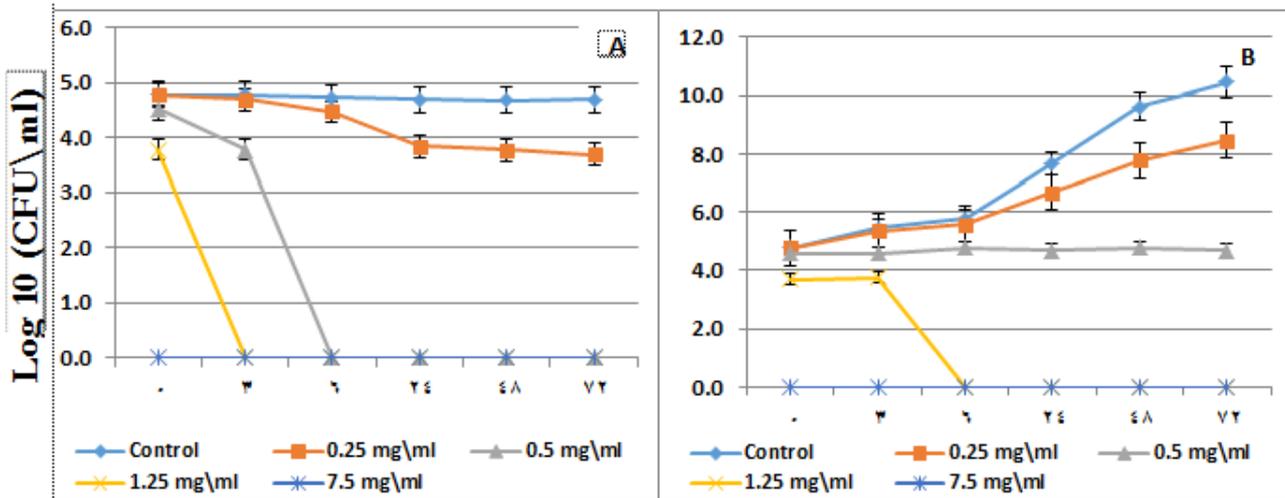
صمم الاختبار بطريقة القطاعات العشوائية الكاملة، ثم حُللت النتائج بواسطة برنامج التحليل الإحصائي SPSS عند مستوى المعنوية $p < 0.01$ للتجارب المخبرية، بطريقة التحليل الإحصائي الأحادي One-Way Anova.

النتائج والمناقشة Results and Discussion:

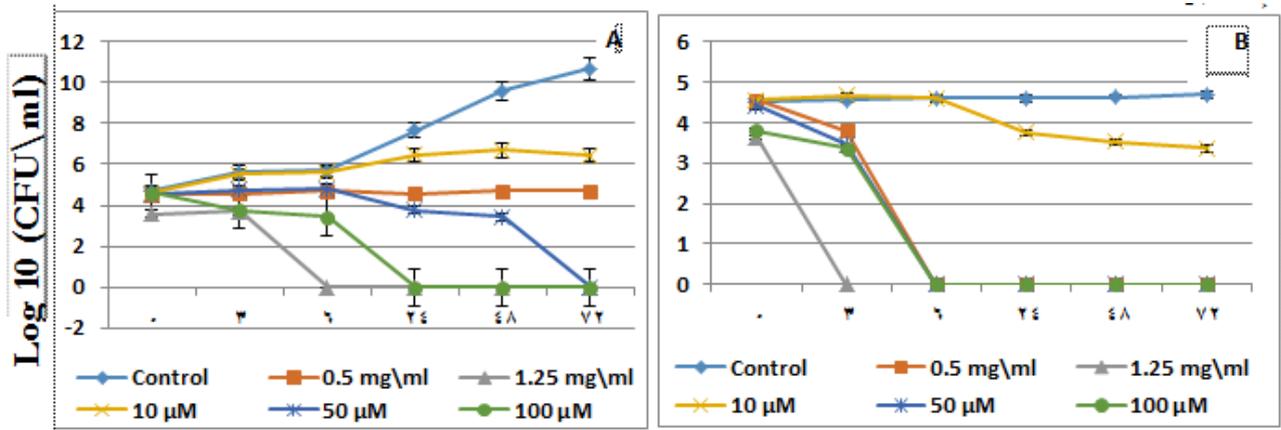
تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على النمو والبقاء: أظهرت النتائج أن لخلاصة وسط الزرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF دوراً سلبياً في قدرة البكتيريا Xcm S101 على النمو والبقاء في كلا الوسطين السابقين، ففي الوسط غير المغذي وعند استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، أظهرت النتائج (الشكل 1-A) فروقاً معنوية عند المستوى $p < 0.01$ بين الشاهد والمعاملات بدءاً من الساعات الأولى من التحصين، حيث انخفض نمو البكتيريا عند الزمن 3 ساعات من التحصين في المعاملات (0.25، 0.5) mg/mL لوغاريتمياً ما يقارب (0.1، 1) على التوالي مقارنة مع الشاهد، أما المعاملات (1.25) mg/mL (7.5) لم يظهر فيها نمو بكتيري، وعند زمن التحصين 6 ساعات استمر النمو البكتيري بالانخفاض لوغاريتمياً في المعاملة 0.25 mg/mL ما يقارب (0.2)، أما بقية المعاملات لم يظهر فيها نمو بكتيري، واستمر النمو بالانخفاض عند التركيز 0.25 mg/mL طيلة فترة التحصين دون أن تسبب في موت البكتيريا، وبالمقارنة مع استخدام الإشارة النقية الـ DSF، أظهرت النتائج (الشكل 2-B) فروقاً معنوية بين الشاهد والمعاملات عند مستوى معنوية $p < 0.01$ بدءاً من الساعات الأولى من التحصين، حيث حافظت البكتيريا على كثافتها العددية في المعاملة (10 µM) من الإشارة النقية الـ DSF ($\leq 90\%$ Sigma) طيلة 6 ساعات من التحصين، قبل أن تبدأ البكتيريا بالانخفاض حيث انخفض معدل نمو البكتيريا لوغاريتمياً عند زمن التحصين 24 ساعة ما يقارب (0.84) مقارنة مع

الشاهد، واستمر نمو البكتيريا في هذه المعاملة بالانخفاض طيلة فترة التحضين دون أن تسبب في موت البكتيريا، بينما سببت بقية المعاملات ($50 \mu\text{M}$ ، $100 \mu\text{M}$) موت البكتيريا بعد (6، 3) ساعات من التحضين على التوالي، وبالتالي تشابهت هذه النتائج مع نتائج استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF. مما يدل على أن إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط الزرع البكتيري والإشارة النقية الـ DSF تلعبان دوراً سلبياً في بقاء البكتيريا. أما في الوسط المغذي وعند استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (الشكل B-1) أظهرت النتائج فروقاً معنوية عند المستوى $p < 0.01$ بين الشاهد والمعاملات بدءاً من الساعات الأولى من التحضين، حيث أدت المعاملة بالتركيز 0.25 mg/mL من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF إلى انخفاض النمو البكتيري لوغاريتمياً ما يقارب (1، 1.8، 2) خلال فترة التحضين (24، 48، 72) ساعة مقارنة مع الشاهد، بينما حافظ التركيز 0.5 mg/mL على التعداد البكتيري طيلة فترة التحضين ولذلك يمكن اعتبار التركيز MBC (الحد الأدنى من تركيز الخلاصة المسببة لتثبيط نمو البكتيريا)، أما التركيز 1.25 mg/mL فقد سبب في موت البكتيريا بعد 6 ساعات من التحضين لذلك يمكن اعتباره MIC (الحد الأدنى من تركيز الخلاصة والمسببة لموت البكتيريا)، وبالمقارنة مع استخدام تراكيز مختلفة من الإشارة النقية الـ DSF، بينت النتائج (الشكل A-2) فروقاً معنوية عند المستوى $p < 0.01$ بين الشاهد والمعاملات بدءاً من الساعات الأولى من التحضين، فعند استخدام التركيز $10 \mu\text{M}$ نمت البكتيريا بشكل مطابق لنمو الشاهد خلال 6 ساعات من التحضين، قبل أن ينخفض النمو البكتيري لوغاريتمياً عند زمن التحضين 24 ساعة بما يقارب (1.26) مقارنة مع الشاهد، ثم حافظت البكتيريا على تعدادها حتى الزمن 48 ساعة من التحضين، قبل أن تبدأ بالتناقص عند الزمن 72 ساعة بما يقارب لوغاريتمياً (4.4) مقارنة مع الشاهد، بينما عند استخدام التركيز $50 \mu\text{M}$ فقد حافظت البكتيريا فيها على كثافتها خلال 24 ساعة من التحضين قبل أن تبدأ بالانخفاض والموت عند زمن التحضين 72 ساعة، وكذلك عند استخدام التركيز $100 \mu\text{M}$ فقد سببت في انخفاض نمو البكتيريا خلال الساعات الأولى من التحضين، ثم سببت في موت البكتيريا بعد 24 ساعة من التحضين. وبالتالي فقد تشابهت هذه النتائج مع نتائج استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF، مما يدل على أن إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية والإشارة النقية الـ DSF تلعبان دوراً سلبياً في نمو البكتيريا Xcm في الوسط المغذي، بينت النتائج السابقة أن تركيز البكتيريا الحية تتناقص كلما زادت تركيز الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية، حيث وُجد أن التركيز 0.25 mg/mL سبب في انخفاض نمو البكتيريا مقارنة مع الشاهد دون أن تسبب في قتلها، بينما التركيز 0.5 mg/mL حافظ على نمو البكتيريا (ثبط نمو البكتيريا) طيلة فترة التحضين، مما قد يدل ذلك على بلوغ إشارات عائلة الـ DSF في هذا التركيز إلى المستوى المطلوب لحث الـ QS مما أدى إلى توقف البكتيريا عن الانقسام والنمو، بينما التركيزين 1.25 mg/mL و 7.5 mg/mL فكان لهما تأثير قاتل للبكتيريا، وعند استخدام الإشارة النقية فكانت النتائج متشابهة في أن التركيز المنخفض $10 \mu\text{M}$ خفض من نمو البكتيريا مقارنة مع الشاهد مع المحافظة على تعداد نمو البكتيريا لمدة زمنية قبل أن تبدأ البكتيريا بالانخفاض، بينما التركيزين 50، 100 μM فكان لهما تأثير قاتل للبكتيريا ظهرت نتائجها خلال الساعات الأولى من التحضين. تشير الدراسات المرجعية بأن عائلة الـ DSF مسؤولة عن تعبير المورثات الضرورية لاستعمار الوسط الحي وغير الحي عند البكتيريا المنتجة لها كـ *Xanthomonas* و *Xylella fastidiosa* و *Stenotrophomonas maltophilia* وغيرها من البكتيريا (Wang وآخرون، 2004، 5؛ Vojnov وآخرون، 2010، 7؛ Den وآخرون، 2011، 6؛ Rott وآخرون، 2013، 7؛ Samal و Chatterjee، 2019، 4؛ Chatterjee وآخرون، 2008، 4)، ويعزى موت البكتيريا في التراكيز

العالية في كل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF إلى عدة أمور منها أولاً: وجود تراكيز عالية من إشارات عائلة الـ DSF وحموض دهنية أخرى في الخلاصة البكتيرية وكذلك التراكيز العالية من الإشارة النقية الـ DSF لم تستطع البكتيريا Xcm S101 هضمها جميعها الأمر الذي أدى إلى تراكمها في الوسط مما أدى إلى موت الخلايا البكتيرية بعد فترة قصيرة من الزمن، حيث أشار Dow وآخرون (2016، 5) إلى قدرة البكتيريا Xcc وXoo على هضم إشارات عائلة الـ DSF في الوسط الذي تعيش فيه عندما يبلغ تركيزها حد معين، وهذا ما يفسر انخفاض النمو كلما زاد تركيز الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الوسط المغذي، وتطابقت هذه النتائج مع Bi وآخرون (2014، 4) الذي أشار إلى أن حدوث طفرتين في المورثتين *RpfB* و*RpfC* للبكتيريا Xcc تؤدي إلى حدوث فرط في إنتاج إشارات عائلة DSF ومشتقات حموض دهنية أخرى إلى الوسط النمو وبالتالي عدم قدرة البكتيريا Xcc على هضم إشارات عائلة DSF ومشتقات الحموض الدهنية الأخرى أو استقلالها الأمر الذي يسبب ارتفاع تركيزها في الوسط مما يؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا البكتيرية وتحللها، وهذا ما أكده Tian وآخرون (2022، 2) الذي أشار إلى أن المورثة *RpfB* عند البكتيريا Xcc تقوم بهضم الإشارة BDSF لتجنيب تثبيط نمو البكتيريا بفعل تراكم التراكيز العالية من الإشارة BDSF، وبالتالي تعمل البكتيريا Xcc على تحقيق التوازن بين QS والنمو من خلال التحكم بتركيز الإشارات البكتيرية الكيميائية. وثانياً كما أشار Lonsecu وآخرون (2013، 7) إلى أن التركيز العالي من الإشارة البكتيرية XfDSF المتراكمة في الأوعية الخشبية للعنب تسبب في منع الخلايا البكتيرية للبكتيريا *Xylella fastidiosa* من النمو مما يؤدي في النهاية إلى موتها حيث تلعب الإشارة XfDSF دوراً كمضاد فوعة يعمل على تثبيط نمو وحركة البكتيريا، وذكر Chatterjee وآخرون (2008، 5) أن تراكم الإشارة DSF المنتجة من الخلايا البكتيرية داخل الأوعية الخشبية تؤدي إلى تثبيط النمو البكتيري للبكتيريا *Xylella fastidiosa*.



الشكل (1): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا XcmS101 على البقاء (A) في الوسط غير المغذي، والنمو (B) في الوسط المغذي، حسب التعداد البكتيري في الوسطين المغذي وغير المغذي لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة لكل تركيزاً بالإضافة إلى الشاهد $\pm SD$.



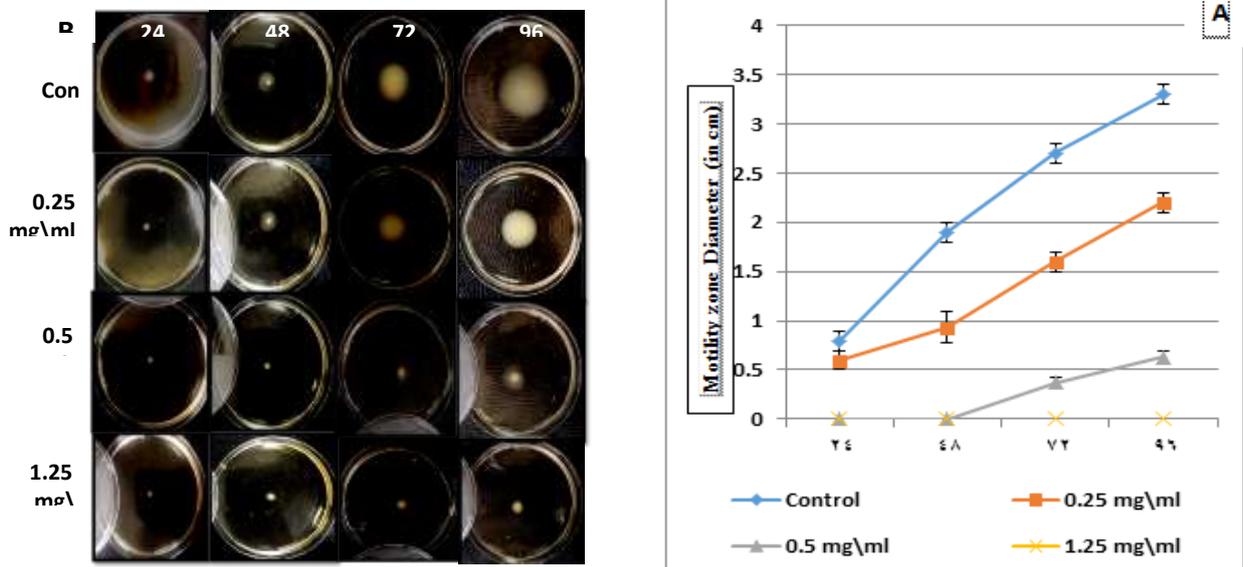
الشكل (2): تأثير الإشارة النقية على النمو البكتيري مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد (ماء مقطر) A: في الوسط المغذي، والبقاء B: في الوسط غير المغذي. حسب التعداد البكتيري في الوسطين المغذي وغير المغذي لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة لكل تركيز بالإضافة إلى الشاهد \pm SD.

وثالثاً: كما أشارت الدراسات المرجعية إلى أن وجود مستويات عالية من إشارات عائلة DSF في المرحلة المبكرة من نمو البكتيريا Xcc يمنع من تشكل الـ Biofilm الأمر الذي يعيق من بقاء البكتيريا على قيد الحياة (Vojnov وآخرون، 2009، 9). رابعاً كما أشارت الدراسات إلى قدرة إشارات عائلة الـ DSF في التحكم في تعبير المورثات المسؤولة عن إنتاج الـ EPS (He وآخرون، 2011، 7) والمسؤولة عن بقاء البكتيريا على قيد الحياة، حيث يؤدي انخفاض الـ EPS عند البكتيريا. *Xanthomonas citri* pv. *axonopodis* (Xac) إلى انخفاض نمو البكتيريا في الوسط المغذي والعائل النباتي، كما ينخفض قدرتها على البقاء على قيد الحياة على سطح العائل النباتي وتتنخفض قدرتها المرضية (Rigano وآخرون، 2007، 5).

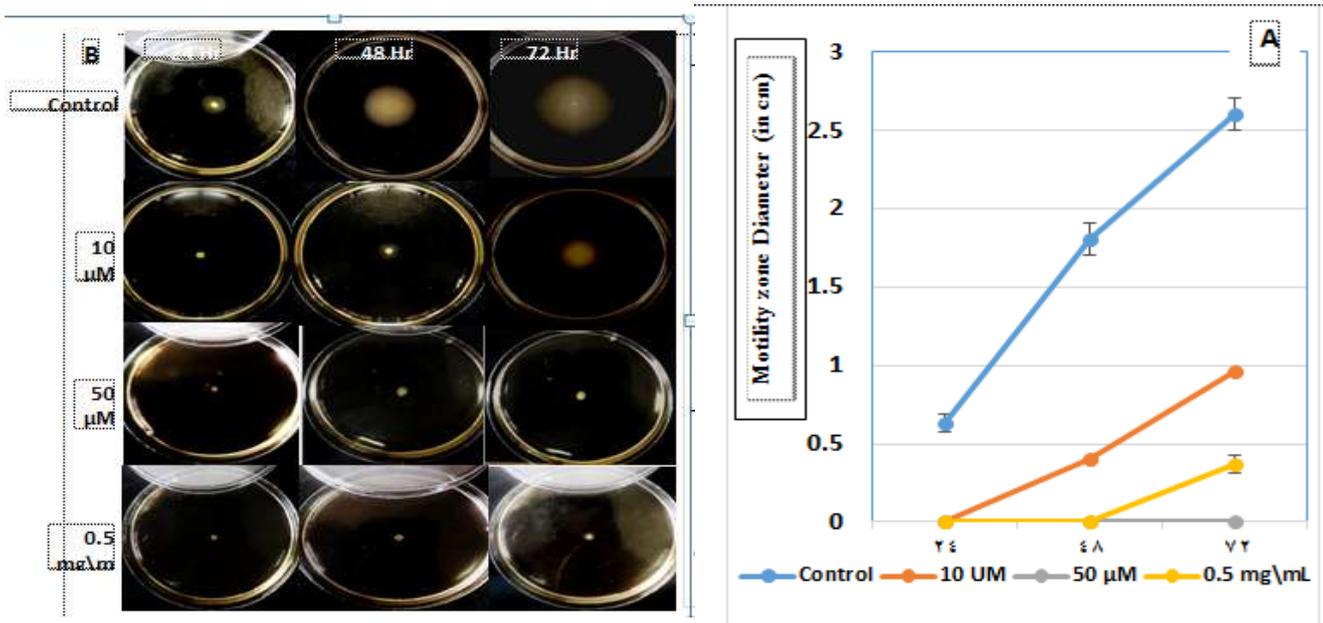
3-3- تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على الحركة:

أظهرت النتائج عند استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (الشكل 3) فروقاً معنوية بين المعاملات والشاهد عند مستوى معنوية $p < 0.01$ بعد 24 ساعة من التحضين، حيث انخفضت حركة البكتيريا كلما زاد تركيز الخلاصة البكتيرية، فعند استخدام التركيز 0.25 mg/ml خُفضت حركة البكتيريا Xcm S101 بنسبة (25، 41، 51، 33) % مقارنة مع الشاهد طيلة فترة التحضين (24، 48، 72، 96) ساعة على التوالي، أما التركيز 0.5 mg/ml قد نُبطت فيها البكتيريا حركتها خلال فترة التحضين (24، 48) ساعة، أما في الزمن (72، 96) ساعة من التحضين أظهرت البكتيريا حركة ولكنها أقل ما يقارب (86، 81) % مقارنة مع الشاهد، أما المعاملة 1.25 mg/ml لم تُظهر فيها البكتيريا أي حركة طيلة فترة التحضين، وتشابهت هذه النتائج مع استخدام الإشارة النقية الـ DSF، حيث بينت النتائج الشكل (4) أن التركيز 10 µM ثبط قدرة البكتيريا على الحركة خلال فترة 24 ساعة من التحضين، أما عند الزمن 48، 72 ساعة كانت حركة البكتيريا منخفضة مقارنة مع الشاهد بنسبة (78، 63) % على التوالي، بينما أظهر التركيز 50 µM القدرة على تثبيط حركة البكتيريا طيلة فترة التحضين. مما تشير النتائج السابقة إلى دور إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية DSF في تنظيم حركة البكتيريا ولكن بشكل سلبي من خلال استهدافها لنظام الحركة عند البكتيريا، وذلك عند استخدام التراكيز المنخفضة من الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية، حيث بينت النتائج السابقة أن التراكيز المنخفضة من الخلاصة البكتيرية 0.25 mg/ml والذي خفض من نمو البكتيريا دون قتلها

والتركيز $10 \mu\text{M}$ من الإشارة النقية الذي خفض من نمو البكتيريا مع المحافظة على الكثافة البكتيرية لمدة زمنية قبل أن تبدأ البكتيريا بالانخفاض قد انخفضت فيها حركة البكتيريا بشكل واضح مقارنة مع الشاهد، أما عند التركيز 0.5 mg/ml والذي وُجد بأنه قد حافظ على كثافة البكتيريا طيلة فترة التحضين قد ثبتت حركة البكتيريا خلال 48 ساعة من التحضين قبل أن تبدأ البكتيريا بالحركة ولكن بشكل بطيء مقارنة مع الشاهد فقد يعود ذلك إلى احتمال تفكك الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF في الوسط مما أدى إلى انخفاض تركيز إشارات عائلة DSF في الوسط مما قد سمح ذلك بإعادة نشاط QS عند البكتيريا وبالتالي القيام بالحركة. أشارت الدراسات المرجعية إلى أن الحركة عند البكتيريا *Xanthomonas* تقع تحت نظام الـ DSF/QS الذي يعمل على تثبيط حركة البكتيريا في الوسط المحيط عند بلوغ إشارة DSF تركيز معين في الوسط وتراكمها فيها، حيث يؤدي تراكم الإشارة الـ DSF في الوسط إلى تثبيط المورثات المسؤولة عن حركة البكتيريا (He وآخرون، 2006، 3؛ Guo وآخرون، 2012، 4؛ Wang وآخرون، 2004، 6)، ومنها المسؤولة عن تشكيل السياط الضرورية لحركة البكتيريا نحو العائل المناسب لها واستعمارها له (He وآخرون، 2006، 8). كما أشارت الأبحاث إلى أن إضافة الإشارة الـ DSF إلى وسط الزرع لكل من *Stenotrophomonas matophilia* و *fastidiosa Xylella* و *Xoo* ثبت من حركتها (An وآخرون، 2018، 6؛ Chatterjee وآخرون، 2008، 4؛ Rai وآخرون، 2012، 5). بينما أشارت دراسات أخرى إلى تحكم الإشارة BDSF في حركة البكتيريا *Burkholderia. sp* (Suppiger وآخرون، 2013، 7). أما عند استخدام التراكيز العالية من الخلاصة البكتيرية (1.25 mg/ml) أو الإشارة النقية الـ DSF ($50 \mu\text{M}$) والتي سببت في تثبيط حركة البكتيريا في الوسط، فيعود ذلك إلى تأثيرها القاتل لنمو البكتيريا بعد زمن من التحضين معهما كما وُجد ذلك في التجارب السابقة من جهة، وتأثيرها على نظام الحركة عند البكتيريا كما أشارت ذلك الدراسات المرجعية آنفة الذكر.



الشكل (3): تأثير إضافة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF إلى وسط الحركة شبه الصلب (NB + 0.3% Agar) على حركة البكتيريا Xcm S101؛ (A) تحديد مدى تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF متمثلة بمتوسط قطر الهالة البكتيرية حول اللطاخة البكتيرية (B) صور تمثيلية لهالات الحركة التي شكلتها البكتيريا XcmS101 حول اللطاخة البكتيرية بالنسبة للشاهد والمعاملات بخلاصة وسط زرع البكتيريا S101 Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بالإضافة إلى الشاهد.

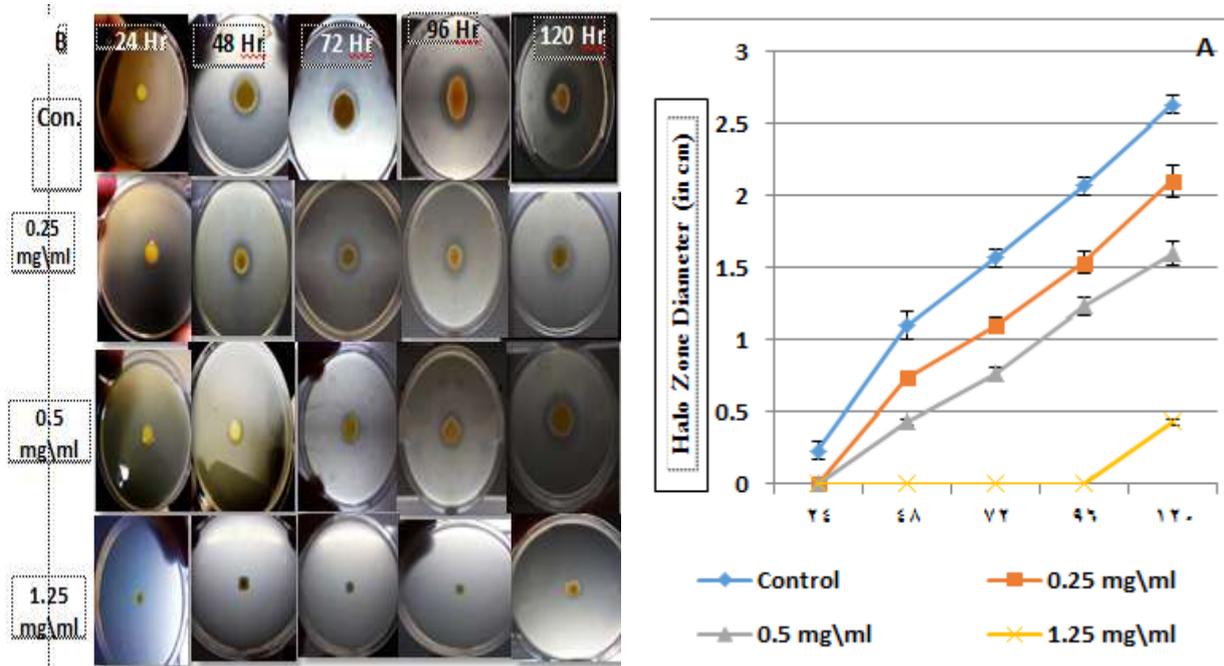


الشكل (4): تأثير إضافة الإشارة النقية الـ DSF إلى وسط الحركة شبه الصلب (0.3% Agar +NB) على حركة البكتيريا Xcm S101، مقارنة مع الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد العام (A): تحديد مدى تأثير الإشارة النقية الـ DSF على حركة البكتيريا مقارنة مع الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد متمثلة بمتوسط قطر الهالة حول اللطاخة البكتيرية لثلاث مكررات مستقلة لكل تركيز بالإضافة إلى تركيز الخلاصة البكتيرية والشاهد \pm SD، (B): صورة تمثيلية لهالات الحركة التي شكلتها البكتيريا Xcm S101 حول اللطاخة البكتيرية بالنسبة للشاهد والمعاملات بالإشارة النقية الـ DSF أو التركيز 0.5 mg/mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF.

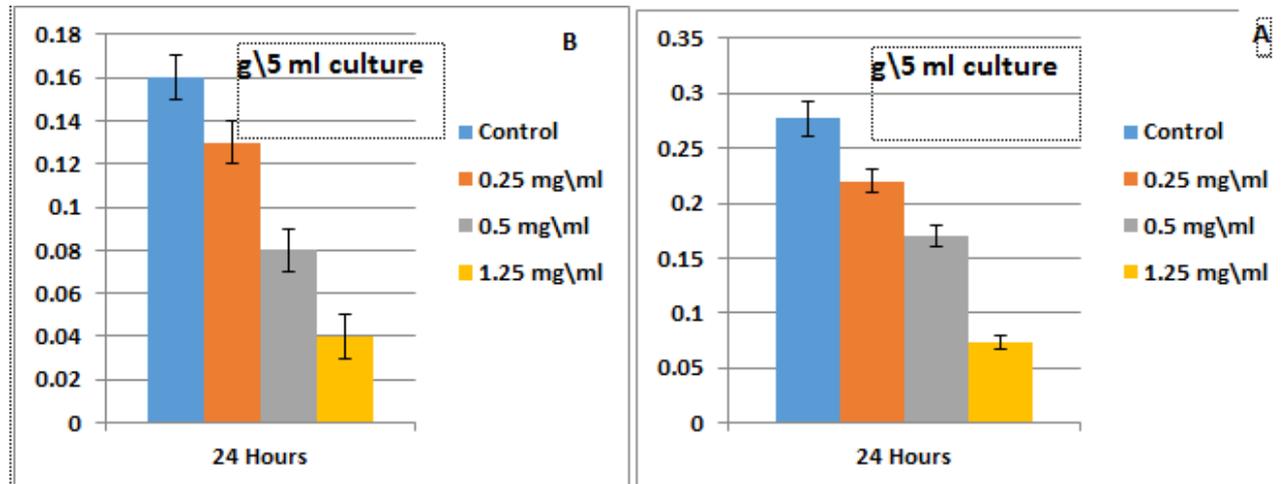
3-4- تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على إنتاج كل من أنزيم البروتياز Protease والسكريات المعقدة الخارجية EPS:

أظهرت النتائج أنّ خلاصة وسط زرع البكتيريا الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF دوراً سلبياً في التحكم بقدرة البكتيريا Xcm S101 على إنتاج كل من البروتياز والسكريات المعقدة الخارجية كلما زاد تركيز الخلاصة البكتيرية، ففي دراسة تأثير الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على إنتاج البروتياز، تُظهر النتائج (الشكل 5) فروقاً معنوية عند مستوى معنوية $p < 0.01$ بين الشاهد والمعاملات بعد 48 ساعة من التحضين، حيث لم تنتج البكتيريا المعاملة بالخلاصة البكتيرية أنزيم البروتياز خلال 24 ساعة الأولى من التحضين مقارنة مع الشاهد، ولكن بعد 48 ساعة من التحضين بدأت البكتيريا المعاملة بالتركيزين 0.5، 0.25 mg/mL من الخلاصة البكتيرية بإنتاج البروتياز ولكن بنسبة أقل بما يقارب (33.4، 61)% مقارنة مع الشاهد، وكان إنتاج البروتياز في المعاملتين السابقتين أقل مقارنة مع الشاهد طيلة فترة التحضين، حيث وصل إلى نسبة ما يقارب (20، 39)% على التوالي مقارنة مع الشاهد عند الزمن 120 ساعة من التحضين، أما المعاملة 1.25 mg/mL لم تنتج فيها البكتيريا لأنزيم البروتياز خلال 96 ساعة من التحضين، ولكن في الزمن 120 ساعة أظهرت فيها البكتيريا إنتاج ضعيف من البروتياز أقل من الشاهد بـ 84%. أشارت بعض الدراسات أنّ البكتيريا Xcc و Xoo ذو الطفرة في المورثة RpfC والتي تعطي كميات فائضة من عائلة DSF انخفض فيها إنتاج البروتياز Protease (He وأخرون، 2006، 4؛ Zhou وأخرون، 2015، 4). وكذلك أشار

Siciliano وآخرون (2006، 5) إلى العزلة الطافرة *RpfC* في البكتيريا *Xanthomonas citri* والتي تعطي إنتاج مفرد من إشارة الـ DSF أدت إلى انخفاض إنتاج الأنزيمات الخارجية المحللة للجدر الخلوية كالبروتياز. أما دراسة تأثير الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على إنتاج السكريات المعقدة الخارجية EPS، أظهرت النتائج فروقاً معنوية بين الشاهد والمعاملات عند مستوى معنوية $p < 0.01$ في كلا الوسطين NB، XLON بعد 24 ساعة من التحضين، حيث يُظهر (الشكل A-6) أن إضافة تراكيز من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (0.25، 0.5، 1.25) mg/mL إلى الوسط المغذي NB أدى إلى انخفاض كمية الـ EPS المنتجة ما يقارب (20.5، 38.6، 73.5) مرة مقارنة مع الشاهد، وكذلك الأمر في الوسط XLON (الشكل B-6) الذي انخفض فيها إنتاج الـ EPS في المعاملات (0.25، 0.5، 1.25) mg/mL ما يقارب (18.7، 50، 75) % مقارنة مع الشاهد. أشارت الدراسات المرجعية (Naman وآخرون، 2015) والتي أشارت إلى أن إنتاج الـ EPS عند البكتيريا Xcm S101 مرتبط بالنمو البكتيري وبالتالي انخفاض النمو البكتيري يؤدي إلى انخفاض الـ EPS، كما تطابقت النتائج مع Torres وآخرون (2007، 6) الذي أشار إلى أن حدوث طفرة *RpfFC* عند البكتيريا Xcc8004 أدى إلى زيادة تركيز كل من الإشارات DSF، BDSF في الوسط بما يعادل 16 ضعفاً مقارنة مع النوع البري، الأمر الذي نتج عنه انخفاض إنتاج الـ EPS والأنزيمات الخارجية (Torres وآخرون، 2007، 6)، وكذلك عند Wang وآخرون (2016، 4) الذي أشار إلى أن حذف المورثة *RpfB* أدى إلى إنتاج عالي من الإشارة الـ DSF و BDSF عند البكتيريا Xoo PX099A الأمر الذي أدى إلى خفض إنتاج الـ EPS، والأنزيمات المحللة الخارجية. وكذلك أشار Zhou وآخرون (2015، 4) إلى أن كل من الإشارتين DSF و IDSF تعمل كمثبطات إنتاج الـ EPS عند وصولها إلى تراكيز عالية في الوسط عند كل من Xcc و Xoo. وأشارت الدراسات المرجعية أن انخفاض كمية الـ EPS المنتجة تؤثر مباشرة على القدرة الإمراضية للبكتيريا وقدرتها على استعمار النسيج النباتي مما يؤدي إلى انخفاض نموها في الوسط الذي تعيش فيه (Vonjov وآخرون، 2017، 9) مما يفتح المجال لإمكانية مكافحة هذه البكتيريا باستخدام إشارتها ضدها. ويعزى الإنتاج المنخفض لكل من البروتياز والسكريات المعقدة الخارجية في البكتيريا المعاملة بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF إلى أسباب متعددة منها تأثير إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية كما تبين سابقاً على نمو البكتيريا، حيث بالمقارنة نجد أن إنتاج البروتياز أو السكريات في المعاملات كانت منخفضة بشكل يوافق انخفاض كثافة البكتيريا في الوسط، أيضاً وجود إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية بشكل مسبق قد أثر على توقيت حدوث الـ QS فجعلت البكتيريا تعبر عن عوامل القدرة الإمراضية قبل وصولها إلى الكثافة العددية الطبيعية المطلوبة لإنتاج عوامل الشراسة.



الشكل (5): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا Xcm S101 على إنتاج أنزيم البروتياز ضمن أطباق تحتوي (NB + 1% حليب منزوع الدسم)؛ (A) تحديد مدى تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على قدرة البكتيريا على إنتاج البروتياز متمثلة بقطر الهالة الشفافة حول اللطاخة البكتيرية (B) صورة تمثيلية للهالات الشفافة حول اللطاخة البكتيرية الناتجة عن إنتاج البكتيريا Xcm S101 للبروتياز وذلك للشاهد أو المعاملة بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF.

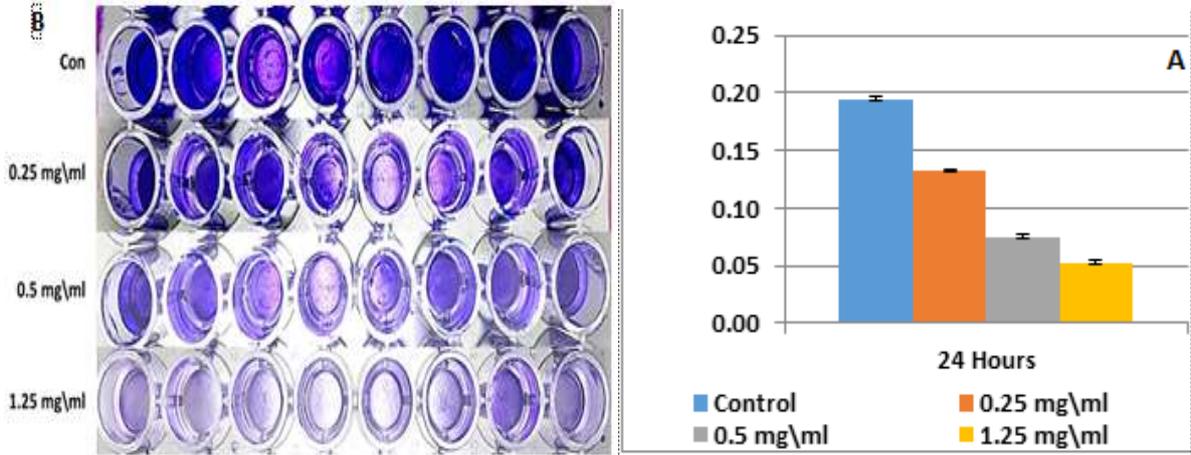


الشكل (6): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF على إنتاج الـ EPS، A: في البيئة NB، B: في البيئة XLON بعد 24 ساعة من التحضين، يدل المخطط على أن إضافة خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF قد خفضت من تشكل السكريات المعقدة الخارجية مقارنة مع الشاهد.

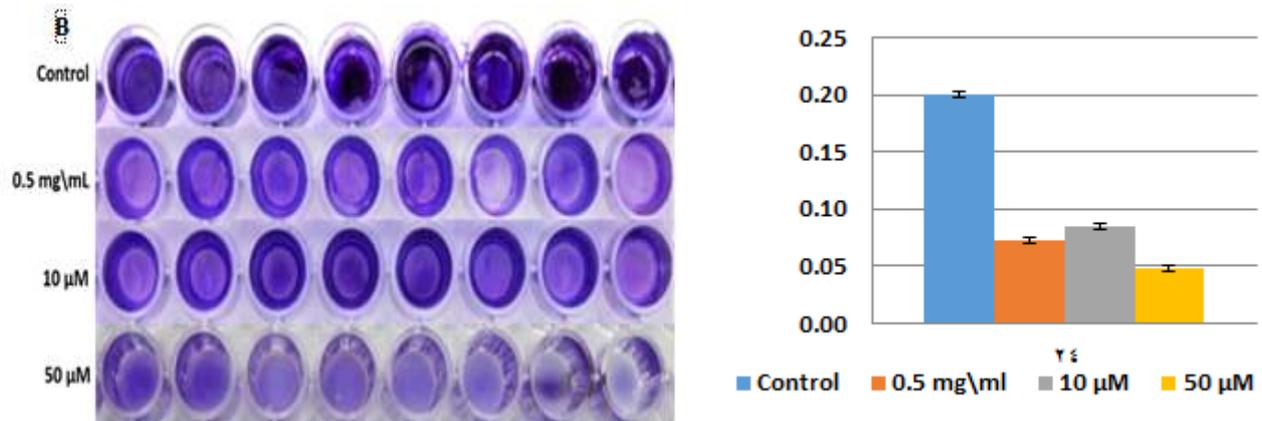
كما ذكر ذلك (Caicedo وآخرون، 2017، 6؛ Dow وآخرون، 2016، 8) الذي أشار إلى أن وجود تراكيز إضافية من الإشارة نفسها التي تتوسط الـ QS عند البكتيريا يجعلها تعبر عن عوامل القدرة المرضية قبل وصولها إلى الكثافة العددية المطلوبة لإحداث المرض مما ينتج عنه انخفاض القدرة المرضية للبكتيريا فيما يُعرف ذلك بتثبيط العامل الممرض Pathogen Confusion أي تجعل البكتيريا تنتج عوامل الشراسة بشكل يتوافق مع الكثافة المطلوبة والتي هي منخفضة نتيجة تأثرها بإشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية.

3-5- تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على تشكل الـ Biofilm:

أظهرت النتائج عند استخدام الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF (الشكل 7) فروقا معنوية بين الشاهد ومعاملات الخلاصة البكتيرية عند مستوى معنوية $p < 0.01$ بعد 24 ساعة من التحضين، حيث انخفضت كمية إنتاج الـ Biofilm تدريجياً في المعاملات $(1.25, 0.5, 0.25) \text{ mg/mL}$ كلما زاد تركيز إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 ما يقارب (31.6، 60، 74) % على التوالي مقارنة مع الشاهد، كما أظهرت النتائج عند استخدام الإشارة النقية (الشكل 8) فروقا معنوية بين معاملات الإشارة النقية الـ DSF والشاهد عند مستوى معنوية $p < 0.01$ بعد 24 ساعة من التحضين، متمثلة بانخفاض إنتاج البيوفيلم في المعاملات $(10 \mu\text{M}, 50 \mu\text{M})$ من الإشارة النقية الـ DSF ($\leq 90\%$ Sigma) والتركيز 0.5 mg/mL من الخلاصة البكتيرية ما يقارب (63.5، 68.9، 69.9) % على التوالي مقارنة مع الشاهد، أظهرت النتائج تطابقاً مع النتائج السابقة ما يدل على أن إشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية DSF تتحكم في قدرة البكتيريا على تشكيل البيوفيلم Biofilm بشكل سلبي. تطابقت هذه النتائج مع الدراسات المرجعية لأنواع بكتيرية أخرى حيث أشار Torres وآخرون (2007، 7) أن إضافة DSF المستخلصة من البكتيريا Xcc 8004 والتي لديها طفرة في المورثة *Rpf C* (الحاوية على تركيز عالي من الـ DSF) إلى وسط النمو للبكتيريا Xcc البرية تؤدي إلى تثبيط تطور تشكل الـ Biofilm. كما أشار Siciliano وآخرون (2010، 5) أن زيادة مستوى الـ DSF في وسط النمو البكتيري أدى إلى انخفاض مستوى تشكل الـ Biofilm تدريجياً، حيث أن التركيز العالي من عائلة الـ DSF يعمل على تثبيط تكوين الـ Biofilm عند Xcc الأمر الذي يعيق بقاء البكتيريا على قيد الحياة (Vojnov وآخرون، 2009، 3)، وأشار Kumar وآخرون (2020، 4) أن البكتيريا Xcc تعمل على تثبيط البيوفيلم Biofilm الخاص بها من خلال التراكيز العالية من الإشارة الـ DSF التي تنظم تعبير المورثات اللازمة لهضم الـ EPS في الوسط الأمر الذي يؤدي إلى تثبيط البيوفيلم.



الشكل (7): تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تشكل الـ Biofilm؛ (A) التحديد الكمي للـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF. (B) صورة تمثيلية للـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF.



الشكل (8): تأثير الإشارة النقية الـ DSF على تشكل الـ Biofilm مقارنة مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والشاهد؛ (A) التحديد الكمي للـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بالإشارة النقية أو التركيز 0.5 mg/ml من الخلاصة البكتيرية متمثلة بمتوسط ثلاث تكرارات لكل معاملة بالإضافة إلى الشاهد \pm SD، (B) صورة تمثيلية للـ Biofilm المتشكل من قبل البكتيريا Xcm S101 الشاهد أو المعامل بالإشارة النقية أو التركيز 0.5 mg/ml من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF.

كما أشار Marques وآخرون (2015، 2) إلى أن إشارات الـ QS التي تستخدمها البكتيريا قادرة على منع تكوين الـ Biofilm وتشتيتها في الوسط ما يفسح المجال لإمكانية استخدامها في مجال مكافحة البكتيريا الممرضة، وأشار Dow وآخرون (2003، 4) أن إشارات عائلة الـ DSF هي مضاد تجمع أي تعمل على تشتيت المجاميع البكتيرية الأمر الذي يؤدي إلى تثبيط تشكل الـ Biofilm. ويُعتبر انخفاض تشكل البيوفيلم في النتائج السابقة من أحد الأسباب التي أدت إلى خفض التعداد البكتيري في معاملات الخلاصة البكتيرية أو الإشارة النقية الـ DSF، حيث أشار Vojnov وآخرون (2009، 4) إلى أن وجود مستويات عالية من إشارات عائلة الـ DSF في المرحلة المبكرة من نمو البكتيريا Xcc يمنع من تشكل الـ Biofilm الأمر الذي يعيق من بقاء البكتيريا على قيد الحياة.

الاستنتاجات :Conclusions

أظهر البحث أنّ وجود تراكيز إضافية لإشارات عائلة الـ DSF في الخلاصة البكتيرية، والإشارة النقية الـ DSF في وسط نمو البكتيريا Xcm S101 يلعب دوراً سلبياً في تنظيم إنتاج عوامل القدرة الإمراضية كالنمو والحركة وإنتاج البروتينات والسكريات المعقدة الخارجية وتشكل البيوفيلم Biofilm، وبالتالي تضاف هذه النتائج إلى مجموعة الدراسات والأعمال البحثية التي تشير إلى دور الإشارات البكتيرية في تنظيم عمل عوامل القدرة الإمراضية، كما أن التدخل في عمل إشارات الـ DSF يفسح المجال أمام استراتيجية جديدة في مجال مكافحة البكتيريا من خلال استهداف نظام الـ QS لديها بالاعتماد على مبدأ تشويش الممرض (Pathogen Confusion)، الذي يعتمد على جعل البكتيريا تعبر عن عوامل القدرة الإمراضية بشكل مسبق دون الوصول إلى الكثافة البكتيرية الضرورية لإحداث الإصابة.

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. يونس، علي؛ جلول، عابدة؛ أبوغرة، محمود. (2018). الكشف عن إشارات التواصل البكتيري من عائلة الـ DSF عند بكتيريا التبقع الزاوي على الفطن *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*. رسالة ماجستير، كلية الزراعة-جامعة دمشق، ص 1-62.
2. An ,S.Q., and Tang, J.L. (2018). Diffusible signal factor signaling regulates multiple functions in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Res Notes (2018) 11:569.
3. Barber,C.E., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wilson,T.J., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P., and Daniels, M.J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. Molecular. Microbiology 243, 555-66. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.3721 736.x.
4. Bi, H., Dong, H., and Cronan, J.E.(2014). *Xanthomonas campestris* RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase. Mol.Microbiol. pp.262-75. Doi:10.1111/mmi.12657.
5. Cai, Z., Yuan,Z.H., Zhang, H., Pan,Y., Wu, Y., and Tian, X.Q. (2017). Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum- sensing and virulence. PLoS Pathog 13(4): pp.223-34. e1006304. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006304>.
6. Caicedo, J. C. Villamizar, S., and Ferro, J. A. (2017). Quorum Sensing, Its Role in Virulence and Symptomatology in Bacterial Citrus Canker. Doi. /10.5772/66721.
7. Chatterjee, A., Aparna, G., and Santi, R.V.(2008). A cell wall-degrading esterase of *Xanthomonas oryzae* requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. Plant Cell21: 1860-1873.DOI 10.1105/tpc.109.066886.
8. Deng, Y., Wu, J., Yin, W., Li, P., Zhou, J., Chen, S., He, F., Cai, J., and Zhang, L.(2016). Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition Env iron Microbiol 18 (5) :1534-45. doi: 10.1111/1 462-2920.13244.
9. Deng, Y., Lim, A., Lee, J., Chen, S., and An, S .(2014). Diffusible signal factor (DSF) quorum sensing signal and structurally related molecules enhance the antimicrobial efficacy of antibiotics against some bacterial pathogens. BMC Microbiol 14: 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-51>.
10. Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y. Q., Feng, J. X., and Tang, J. L.(2003). Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. DOI: 10.1073/ pnas.1833360100
11. Fouhy, Y., Scanlon, K., Schouest, K., Spillane, C., Crossman, L., and Avison, M.B. (2007). Diffusible Signal Factor- Dependent Cell-Cell Signaling and Virulence in the Nosocomial Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. J Bacteriol 189:4964-8. doi: 10.1128/JB.00310-07.
12. Guo, Y., Zhang, Y., Li, J.L., Wang, N. (2012). Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Mol Plant Microbe Interact;25(2):165-79. DOI:10. 1094/mpmi-07-11-0184.
13. He, Y.W., Wu, J., Zhou, L., Yang, F., He, Y.Q., Jiang, B.L., Bai, L., Xu, Y., Deng, Z., Tang, J.L., and Zhang, L.H. (2011). *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity and systemic invasion. DOI: 10.1094/MPMI-02-11-0031.
14. He, Y.W., Zhou, L., Wang, X.Y., and Jiang, B.L.(2015). Identification and characterization of naturally occurring DSF-family Quorum Sensing signal turnover system in the phytopathogen *Xanthomonas*. Environ Microbiol 17:4646-4658. DOI: 10.1111/1462-2920.12999.

15. He, Y.W., Xu, M., YJ, N., Wang, L.H., Zhang, H.B., and Dow, J.M. (2006). Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*: identification of novel cell-cell communication- dependent genes and functions. *MOL. Microbiol.*: 610-22. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04961.x.
16. He, Y.W., Wu, W., Cha, J., and Zhang, L.H. (2010). Rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* produces multiple DSF-family signals in regulation of virulence factor production. *BMC Microbiol.* 10,187. Doi.147-218/10/187.
17. Jalloul, A., Sayegh, M., Champion, M., Nicole, M. (2015). Bacterial blight of cotton. in *Phytopathology Mediterranean* 54(1):3-20. P.233-243.
18. Kakkar, A., Nizampatnam, N.R., A. Reddy, K., Pradhan, B. B., and Chatterjee, S. (2015). *Xanthomonas campestris* cell-cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. *Journal of Experimental Botany*. 212-219. Doi.10.1093/jxb/erv377.
19. Lonescu, M., Baccari, C., Da, Silva., A. Garcia., K. Yokota., and S.E, Lindow. (2013). Diffusible Signal Factor (DSF) Synthase RpfF of *Xylella fastidiosa* is a Multifunction Protein Also Required for Response to DSF. *J Bacteriol* 195,52 73-84. DOI.10.1128/JB.00713-13.
20. Marques, C. N. H., Davies, D.G., and Sauer, K. (2015). Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid. *Pharmaceuticals* 2015, 8, 816-835; doi: 10.3390/ph8040816.
21. Qian, G., Zhou, Y., Zhao, Y., Song, Z., Wang, S., Fan, J., Hu, B., Venturi, V., and Liu, F. (2013). Proteomic Analysis Reveals Novel Extracellular Virulence-Associated Proteins and Functions Regulated by the Diffusible Signal Factor (DSF) in *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*. *American Chemical Society*. dx.doi.org/10.1021/pr4001543.
22. Rai, R., Ranjan, M., Binod, B., and Chatterjee, S. (2012). Atypical Regulation of Virulence-Associated Functions by a Diffusible Signal Factor in *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *The American Phytopathological Society*. pp. 789–801.
23. Rai, R., Javvadi, S., and Chatterjee, S. (2015). Cell-cell signalling promotes ferric iron uptake in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that contribute to its virulence and growth inside rice. *Mol Microbiol*. doi: 10.1111/mmi.12965.
24. Rigano, L.A, Payette, C., Brouillard, G., Marano, M.R., Abramowicz, L., Torres, P.S., Yun, M., Castagnaro, A.P., Oirdi, M.E., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J.M., Bouarab, K., and Vojnov, A.A. (2007). Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell* 19: 2077–2089.
25. 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.
26. Naman, R., Jalloul, A., Abo-Ghorrah, M. (2015). Quorum sensing system in *Xanthomonas citri* pv. *mlavacearum* regulation of some virulence genes expression. Master thesis-Damascus university.
27. 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.
28. Ryan, R.P., S.Q, An., J, Allan., Y, McCarthy., and J.M, Dow. (2015). The DSF family of Cell-Cell Signals: An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators. *POLS.ppat*.1004986.
29. Samal, B., and Chatterjee, S. (2019). New insight into bacterial social communication in natural host: Evidence for interplay of heterogeneous and unison quorum response. *PLoS Genet* 15(9): e1008395. pp.1-23.
30. Schmid, N., Pessi, G., Deng, Y., Aguilar, C., Carlier, A.L., Grunau, A., Omasits, U., Zhang, L.H. et al. (2012). The AHL- and BDSF-dependent quorum sensing systems control specific and overlapping sets of genes in *Burkholderia cenocepacia*. DOI.10.1371/journal.pone.0049966.
31. Siciliano, F., Torres, P., Sendin, L., Bermejo, C., Filippone, P., Vellice, G., Ramallo, J., Castagnaro, A., Vojnov, A., and Marano, M. R. (2006). Analysis of the molecular basis of *Xanthomonas axonopodis* pv.

- citri* pathogenesis in Citrus limon. Electron. J. Biotechnol. 9:200-204.DOI.10.4067/50717-345820060003000005.
32. Suppiger, A., Schmid, N., Aguilar, C., Pessi, G., and Eberl, L. (2013). Two quorum-sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the Burkholderia cepacia complex. Virulence 4: 400-9.
 33. Tian, X.Q., Wu, Y., Cai, Z., Qian,W.(2022). BDSF is a degradation-prone quorum sensing signal detected by the histidine kinase RpfC of Xanthomonas campestris pv. campestris. Biorxiv.pp.1-32 Doi.org10.1101/2022.01.03.474871.
 34. Torres, P.S., Malamud, F., Rigano, L.A., Russo, D.M., Marano, M.R., Castagnaro, A.P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J, M., and Vojnov, A.A.(2007). Controlled synthesis of the DSF cell–cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. Environmental Microbiology. 9(8), 2101–2109.
 35. Vanderleyden ,D.R., and Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 28, 261e289.
 36. Vojnov A, A., Do, A.M., Amaral., J, Dow, M., Cai, A.P., and Marano, M. R. (2009). Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. Appl Microbiol Biotechnol 87:467–477.Doi.10.1007/s00253-010-2631-2
 37. Wang, S., Lian, H.W., Yawen, H., Yunfeng, G., Wu, J-E., Dong, Y.H., He, C., Weng, L., Xu, J.L., Rai, L.T., Fang, X., and Zhang, L.H.(2004). A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. Molecular Microbiology .doi:10.1046./j.1365-2958.2003.03883.x.
 38. Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.(2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibacterial substances. Nature protocols. DOI.10.1038/nprot.2007.521.
 39. Xu ,J., Zhou, L., Venturi, V., He, Y.W., Kojima, M., Sakakibari, H., Höfte, M., and Vleeschauwer, D.De. (2015). Phytohormone-mediated interkingdom signaling shapes the outcome of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions. BMC Plant Biology.15:10.DOI.10.1016/j.pbi.2013.02.2008.
 40. Zhou, L., Zhang, L.H., Cámara, M., and He, Y.W.(2016). The DSF Family of Quorum Sensing Signals :Diversity, Biosynthesis, and Turnover. Cell press. Review. DOI.10.1016/j.tim.2016.11.013.
 41. Zhou,L., Yu, Y., Chen, X., Abdeen Diab, A., Ruan, L., He, J., Wang, H., and He ,Y.W.(2015). The Multiple DSF-family QS Signals are Synthesized from Carbohydrate and Branched- chain Amino Acids via the FAS Elongation Cycle. *Sci. Rep.* 5, 13294; doi: 10.10 38/srep 13294.

