

تأثير إشارات التواصل البكتيري من عائلة الـ DSF على تطور بكتيريا التبغ الزاوي *Xanthomonas citri* subsp. *Malvacearum* وعلى ردود الفعل الدفاعية عند نبات 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:

نفذ هذا البحث خلال عام 2020-2021م، الذي هدف إلى دراسة تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* S101 (Xcm S101) الحاوية على إشارات عائلة Diffusible Signal Factor-family (DSF) بتركيز 0.5 mg/mL، والإشارة النقية الـ DSF بتركيز 100 µM في الحد من نمو وتطور البكتيريا Xcm S101، وفي ردود الفعل الدفاعية عند نبات القطن، أظهرت النتائج انخفاضاً لوغاريتمياً في نمو البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلجية للنبات، والتي حُفنت مسبقاً بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية الـ DSF ما يقارب (2.85، 2.19) على التوالي مقارنة مع الشاهد بعد 4 أيام من العدوى البكتيرية، أما الأنسجة النباتية والتي حُفنت بمعلق حاوي على البكتيريا Xcm S101 والخلاصة البكتيرية الحاوية إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية الـ DSF انخفض فيها نمو البكتيريا Xcm S101 لوغاريتمياً ما يقارب (3.6، 2.54) على التوالي مقارنة مع الشاهد بعد 4 أيام من العدوى البكتيرية، كما أظهرت النتائج زيادة في ردود الفعل الدفاعية في الأوراق الفلجية المعاملة بكل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو بالإشارة النقية الـ DSF كتراكم بيروكسيد الهيدروجين وتحفير نظام الموت الخلوي المبرمج، وزيادة مستوى أنزيم البيروكسيدياز والذي بلغ في الأوراق الفلجية بعمر 10 أيام التي نُفعت بذورها مسبقاً بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو بالإشارة النقية الـ DSF ما يقارب (94.32، 85.9) nankatal/mg مقارنة مع الشاهد الذي بلغ 37.55

تاريخ الإيداع: 2022/4/27

تاريخ القبول: 2022/6/23



حقوق النشر: جامعة دمشق -
سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق
النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

nanKatal/mg، أما الأوراق الفلقية بعمر 10 أيام التي عولمت بطريقة الرش بالخلصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو بالإشارة النقية الـ DSF بلغ فيها مستوى أنزيم البيروكسيداز ما يقارب (104.62، 88.95) nanKatal/mg على التوالي مقارنة مع الشاهد الذي بلغ 63.211 nanKatal/mg بعد 48 ساعة من المعاملة.

الكلمات المفتاحية: عائلة الـ DSF، Xcm S101، بيروكسيد الهيدروجين، الموت الخلوي المبرمج، أنزيم البيروكسيداز

Effect bacterial communication signals of DSF-family on development of angular spot bacterial *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* and defense responses at cotton plant.

Ali Mohamad Younes¹, Pro. Mahmoud Hasan Abogurrah²,
Pro. Manal Nezar Daghestani³

1 Ph.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:

This research was conducted during 2020-2021. Which aimed to study the effect of the Diffusible Signal Factor (DSF) family-containing extract of culture of the bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* S101 (Xcm S101) at concentration of 0.5 mg/mL, and the pure DSF signal at concentration of 100 μ M in limiting the growth and development of bacteria Xcm S101, and in defense responses in cotton plant. The results showed a logarithmic decrease in the growth of bacteria Xcm S101 in the plant tissues of the cotyledon leaves of the plant, which were previously injected with the DSF family-containing extract of culture, or the pure DSF signal, were approximately (2.85, 2.19), respectively compared with the control after 4 days of bacterial infection. While the plant tissues of the cotyledons of the cotton plant, which were injected with a suspension containing the DSF family-containing extract of culture, or the pure DSF signal, the Xcm S101 bacteria showed a logarithmic decrease in growth approximately (3.6, 2.54), respectively, compared to the control after 4 days of bacterial infection, and the results also showed an increase in defense responses in cotyledon leaves which treated with both the DSF family-containing extract of culture, or the pure DSF signal as: hydrogen peroxide accumulation and induce the programmed cell death system, and increased the level of peroxidase enzyme, which reached in the 10-day-old cotyledon leaves whose seeds were pre-soaked with the DSF family-containing extract of culture, or pure DSF signal approximately nanKatal/mg (94.32, 85.9) compared with the control that reached 37.55 nanKatal/mg, while the 10-day-old cotyledon leaves treated by spraying with the DSF family-containing extract of culture or the pure DSF signal had the peroxidase enzyme level of approximately (104.62, 88.94) nanKatal/mg, respectively compared with the control, which reached 63.211 nanKatal/mg at 48 hours after treatment.

Keywords: DSF-Family, Xcms101, Peroxide Hydrogen, Cell Death Program, Peroxidase.

Received: 27/ 4 /2022

Accepted: 23/ 6 /2022



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

المقدمة Introduction:

تؤثر الممرضات النباتية المختلفة على النباتات من مرحلة الزراعة، حتى حصاد وتخزين المنتجات، من خلال ما تنتجه وتفرزه من عوامل شراسة كالأنزيمات المحللة للجدر الخلوية والسموم وغيرها من تلك العوامل، ولكي تتجو النباتات من الآثار الضارة لتلك التفاعلات العدائية، عليها أن تتغلب على الآليات التي تستخدمها الممرضات والتي تؤدي إلى حدوث المرض (Doughari، 2015)، وعلى الرغم من افتقار النباتات إلى نظام مناعي مماثل للحيوانات، فقد طوّرت النباتات مجموعة مذهلة من الدفاعات البنيوية والكيميائية والبروتينية المصممة لاكتشاف الكائنات الغازية، ومنعها قبل أن تتمكن من إحداث أضرار واسعة النطاق (Doughari، 2015). حيث طوّرت النباتات القدرة على التعرف على العديد من الجزيئات الميكروبية المفترزة إلى الوسط الخارجي، والتي ترتبط بالسطح النباتي لتحقيق استجابة دفاعية ضدها، يوجد العديد من الخصائص الميكروبية كالمسببات البكتيرية، وعديدات السكر الليبيدية Lipopolysaccharides (LPS)؛ والمعروفة باسم الأنماط الجزيئية المرتبطة بالكائن المرض Pathogen associated molecular patterns (PAMPs)، والتي تعمل كمثيرات للمقاومة، (Newman وآخرون، 2002، 4؛ Silipo وآخرون، 2005، 5)، يحدث هذا التعرف على المثيرات بشكل أساسي من خلال المستقبلات الموجودة على سطح الخلية النباتية، حيث يؤدي إلى الاستجابة الدفاعية الذاتية أو القاعدية، والتي تحد من نمو المسبب المرضي في المنطقة المجاورة مباشرة لمنطقة الإصابة من نسيج النبات العائل (Hartman وآخرون، 2016، 6)، ومن هذه المثيرات التي اكتشفت حديثاً إشارات التواصل البكتيري Quorum Sensing Signals (QS) والتي تستخدمها البكتيريا للتواصل فيما بينها لتنظيم تعبير عوامل الشراسة لديها في الوسط الذي تعيش فيه، كتنظيم تعبير المورثات المسؤولة عن الأنزيمات المحللة للجدر الخلوية، واستهلاك الحديد، والنمو، والحركة وغيرها (Bassler و Waters، 2005، 3)، أشارت الدراسات السابقة أنّ الأفعال المتبادلة بين النبات والبكتيريا يمكن أن تنظّمها الإشارات البكتيرية (Torres وآخرون، 2007، 6)، هذه الدراسات أثارت اهتمام العلماء في العصر الحديث بسبب الآثار الإيجابية لمختلف إشارات التواصل البكتيري على النبات، بدءاً من تعزيز قدرة النباتات على النمو إلى تحفيز ردود الفعل الدفاعية عندها ضد مسببات المرضية المختلفة، في الآونة الأخيرة بدأ العلماء فهم الآليات الجزيئية التي تقوم عليها استجابة النباتات لإشارات التواصل البكتيري (Schikora وآخرون، 2016، 3). إنّ الدراسة الأولى التي أشارت إلى تأثير إشارات التواصل البكتيري من عائلة Acyl Homoserine Lactones (AHLs) على فسيولوجية النبات نشرت في عام 2003 من قبل العالم Mathesius وآخرون، حيث أكد أنّ البروتينات المرتبطة بالدفاع والإجهاد، والبروتينات المرتبطة باستقلاب الفلافونيدات، والهرمونات، قد تراكمت بشكل تفاضلي في النباتات المعاملة بـ AHLs.

ومن ناحية ثانية أشارت مجموعة من الدراسات المرجعية إلى دور إشارات عائلة الـ DSF - التي تتوسط نظام الـ QS عند عدد من البكتيريا سالبة الغرام منها الجنس *Xanthomonas* وغيرها (Wang وآخرون، 2004، 3) - كمثيرات للمقاومة على شكل PAMPs في النبات، حيث أشار Kakkur وآخرون (2015، 7) إلى أن المعاملة المسبقة لنباتات الرز بالإشارة DSF قد حفز من ردود الفعل الدفاعية والبروتينات المرتبطة بالعامل الممرض Pathogen related-protein (PR-Protein) الأمر الذي أدى إلى انخفاض نسبة الإصابة بالمرض عند نبات الرز عند إصابته بالبكتيريا *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)، كما وجد Alavi وآخرون (2013، 1) أنّ إشارة الـ DSF تلعب دوراً في تحسين نمو وصحة نبات اللفت الزيتي Rapeseed عند معاملة بذورها بها، أو كعامل مكافحة بيولوجية ضد الممرضات البكتيرية التي تنتجها من خلال طريقة إرباك العامل الممرض Pathogen Confusion (Caciedo وآخرون، 2017، 3) حيث استخدمت هذه الطريقة في مكافحة البكتيريا *Xylella fastidiosa* (XF) المسبب لمرض

التدهور السريع على العنب والزيتون، وذلك من خلال إما التعديل الوراثي وجعل النبات ينتج إشارات عائلة الـ DSF أو إضافة خارجية لهذه الإشارات في النبات، حيث أدى ذلك إلى توقف الممرض عن النمو والانتشار والحركة وانخفضت الشدة المرضية في النبات المعامل (Lonescu وآخرون، 2016، 4؛ Lindow وآخرون، 2014، 128؛ Attom وآخرون، 2014، 82). كما وُصف الـ DSF لأول مرة بواسطة Wang وآخرون (2004، 2) بأنه cis-11-methyl-2-dodecenoic acid عند *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)، وُجد في السنوات القليلة الماضية الـ DSF عند البكتيريا Xoo (He وآخرون، 2010) و (XF) (Chatterjee وآخرون، 2008). كما اكتشف عدد من مشتقات جزيئة الإشارة DSF عند عدد من الأنواع البكتيرية منها cis-2-dodecenoic acid (BDSF)، cis-11-methyldodeca-2,5-dienoic acid (CDSF) عند البكتيريا Xcc و Xoo، و-2-cis-2-tetradecenoic acid، 12-methyltetradecenoic acid، cis-hexadecenoic acid عند البكتيريا XF (He وآخرون، 2011، 3؛ Zhou وآخرون، 2015، 4؛ He وآخرون، 2015، 2). ويتحكم الـ DSF ومشتقاته بعدد من الوظائف الحيوية عند البكتيريا المنتجة لها كاستعمار أنسجة العائل النباتي وقدرتها على النمو والتطور عند البكتيريا Xcc (Rigano وآخرون، 2007، 3) و Xoo (Rai وآخرون، 2015، 6).

أما عند البكتيريا Xcm S101 فكانت أول دراسة للكشف عن عائلة الـ DSF أجراها (يونس وآخرون، 2018)، حيث اكتشف مجموعة من عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 بواسطة جهاز مطياف الكتلة اللوني السائل Liquid Chromatography-mass spectrometry (LC-MS)، وُجد أنها تنتج وتفرز سبعة مشتقات حموض دهنية تابعة لعائلة الـ DSF وهي: Cis-11-methyl-2-dodecenoic acid (DSF) و cis-2-undecenoic acid و 11-methyldodecanoic acid و (BDSF) Cis-2-dodecenoic acid و (CDSF) Cis-11-methyldodeca-2,5-dienoic acid و 12-methyltetradecanoic acid. ويعد Xcm S101 أحد أخطر الممرضات النباتية التي تصيب نبات القطن حيث يهاجم معظم أجزاء النبات مسبباً له خسائر اقتصادية كبيرة كما ونوعاً (Young وآخرون، 1996، 6).

هدف البحث Research objective:

انطلاقاً من أهمية دور إشارات عائلة الـ DSF التي تتوسط الـ QS عند بكتيريا جنس *Xanthomonas* في التحكم في التفاعلات المتبادلة بين البكتيريا المنتجة لها والعائل النباتي، وإمكانية استخدام هذه الإشارات كعوامل مكافحة بيولوجية ضد البكتيريا المنتجة لها بطريقة إرباك العامل الممرض Pathogen Confusion ضمن العائل النباتي، وكمحفزات للمقاومة للنبات المعامل بها، هدف البحث إلى دراسة تأثير كلاً من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية DSF في الحد من نمو وتطور البكتيريا Xcm S101 وعلى ردود الفعل الدفاعية في الأنسجة النباتية لنبات القطن المعامل بهما.

مواد البحث وطرائقه Methods and Materials:**مكان تنفيذ البحث:**

أجري هذا البحث خلال العام 2020-2021م 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. ويهدف تنمية البكتيريا ولاستخلاص إشارات عائلة الـ DSF استخدمت الأوساط الغذائية: الآغار المغذي Nutrient Agar (NA) والحاوي على: بيبتون 0.5%، خلاصة اللحم 0.3%، سكروز 1%، خلاصة الخميرة 0.1%، آغار 1.5%، pH=7. B- المرق المغذي Nutrient Broth (NB) والحاوي على: بيبتون 0.5%، خلاصة اللحم 0.3%، سكروز 1%، خلاصة الخميرة 0.1%، pH=7

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

أستخلصت جزيئات DSF-family من وسط زرع البكتيريا Xcm S101 بواسطة خلات الإيثيل، حسب طريقة Zhou وآخرون (2017، 6) مع بعض التعديلات التي أجراها يونس وآخرون (2018)، ثم حُفظت خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات DSF-family 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:

حُضرت الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF للتجارب من خلال اتباع طريقة (Kakkar وآخرون، 2015، 8)، حيث حُضرت الإشارة النقية الـ DSF ($\leq 90\%$ Sigma) بتركيز 1 mM وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF 20 mg/mL بواسطة 20% ميثانول Methanol في ماء مقطر كتركيز أساسية، ثم مددت بالماء المقطر أو وسط المرق المغذي NB حسب التجربة المستخدمة حتى الحصول على التراكيز 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 تطور البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلقية لنبات القطن:

دُرِس تأثير كل من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على تطور البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية لنبات القطن، حيث عوملت بذور القطن صنف حلب (33) بحمض الكبريت التجاري لمدة دقيقة للتخلص من الألياف القطنية ومن أي حمولة بكتيرية أو فطرية على سطح البذور، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم ثلاثة مرات للتخلص من الآثار المتبقية من حمض الكبريت التجاري، ثم نقلت مباشرة إلى أصص حاوية على تورب معقم بمعدل 4 بذور في كل أصيص، وحُضنت الأصص عند درجة حرارة 28°C وبرتوبة 80%، وبعمر 10 أيام للأوراق الفلقية للنباتات، قسمت النباتات إلى قسمين: القسم الأول حُقنت بالإشارة النقية DSF بتركيز 100 μ M أو بالتركيز 0.5 mg/mL من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو بالماء المقطر كشاهد بمعدل 4 أصص لكل معاملة (16 نبات لكل معاملة) بالإضافة إلى الشاهد، وبعد 24 ساعة من التحضين أُجريت عليها عدوى اصطناعية بطريقة الحقن بإبرة منزوعة السرغ بمعلق بكتيري ذو كثافة ضوئية ($OD_{600}=0.1$) ما يقارب ($10^8 \times 2$ CFU/mL) لكامل سطح الورقة الفلقية، والقسم الآخر حُقنت بواسطة إبرة منزوعة السرغ بمعلق حاوي على البكتيريا Xcm S101 بكثافة ضوئية ($OD_{600}=0.1$) ما

يقارب $CFU/mL (2 \times 10^8)$ مع الإشارة النقية الـ DSF بتركيز $100 \mu M$ أو التركيز $0.5 mg/mL$ من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو بالماء المقطر كشاهد، بمعدل 4 أصص لكل معاملة (16 نبات لكل معاملة) بالإضافة إلى الشاهد، ثم حُصّنت النباتات عند درجة حرارة $28^\circ C$ وبرطوبة 80%، وقيم النمو البكتيري في الأنسجة النباتية خلال 10 أيام من العدوى بالطريقة الأولى و 5 أيام من العدوى في الطريقة الثانية بتقنية عد الصفائح حسب طريقة (Marmery وآخرون، 2007)، حيث جُمعت خمسة أقراص باستخدام مسبار من الحديد ذو قطر 0.56 Cm، ثم عُمت بالكحول 75% لمدة دقيقتين وُعسلت بالماء المقطر المعقم مرتين للتخلص من آثار الكحول، وسُحقت في 5 mL من الماء المقطر المعقم باستخدام هاون معقم، ثم حُفّف المعلق عدة تخفيفات ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$) بالماء المقطر المعقم، ثم أُخذ $10 \mu L$ من كل تخفيف ووضعت على أطباق NA وحُصّنت الأطباق عند درجة حرارة $28^\circ C$ لمدة 48 ساعة، ثم حُسب التركيز البكتيري في الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية المُلقحة، وتم التعبير عنه في الأنسجة بـ $\log_{10} CFU/Cm^2$. كُررت التجربة ثلاثة مرات دُرس من خلالها تأثير الإشارة النقية الـ DSF وخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF تطور البكتيريا Xcm S101 مقارنة مع الشاهد.

تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على تراكم بيروكسيد الهيدروجين والموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية لنبات القطن.

حُفّنت الأوراق الفلقية بعمر 10 أيام لنباتات القطن بواسطة سرنغ منزوعة الإبرة بمستخلص وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF بتركيز $0.5 mg/mL$ أو بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز $100 \mu M$ أو بالماء المقطر كشاهد وبعد 24 ساعة من الحقن أخذت قسم من النباتات بمعدل 4 نباتات لكل معاملة بهدف الكشف عن تراكم إنتاج بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في الأنسجة النباتية المُعاملة باستخدام صبغة ثنائي أمينو البنزدين 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) حسب طريقة Daudi وآخرون (2012)، حيث وُضعت الأوراق الفلقية ضمن أطباق بتري تحوي الصبغة DAB ووضعت الأطباق ضمن حاضنة راحة عند سرعة 80 دورة/دقيقة ودرجة حرارة $25^\circ C$ لمدة 6 ساعات، نقلت بعدها الأوراق الفلقية إلى أطباق بتري جديدة تحوي على محلول إزالة الكلوروفيل (إيثانول: حمض اللاكتيك: غليسيرول) بنسبة 1:1:3، ولمدة 24 ساعة وبعد إزالة الكلوروفيل، نُقلت الأوراق إلى سطح ذو خلفية بيضاء ليتم تصويرها. بينما كُشّف عن موت الخلايا المبرمج من خلال من خلال صبغة Lactophenol trypan blue (أزرق لكتوفينول تريبان) حسب طريقة Bautista وآخرون (2016)، حيث أُخذ القسم الآخر من النباتات الفلقية بمعدل 4 نباتات لكل معاملة، ووضعت أوراقها ضمن أطباق بتري تحوي على صبغة أزرق لكتوفينول تريبان وبعد ساعة من التصبغ، عُسلت الأوراق بالإيثانول (98%) لإزالة بقايا الصباغ، ووضعت ضمن أطباق بتري حاوي على الإيثانول (98%) طوال الليل، تم استبدال الإيثانول بأخر جديد حتى أُزيل الكلوروفيل من الأوراق بشكل نهائي، ثم عُمت الأوراق بالجليسيرول 60%، ونُقلت إلى سطح ذو خلفية بيضاء ليتم تصويرها.

تأثير خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على فعالية أنزيم

البيروكسيداز Peroxidase:

1. تحضير الأوراق الفلقية للمعاملات:

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

2. تحضير المستخلص الأنزيمي الخام:

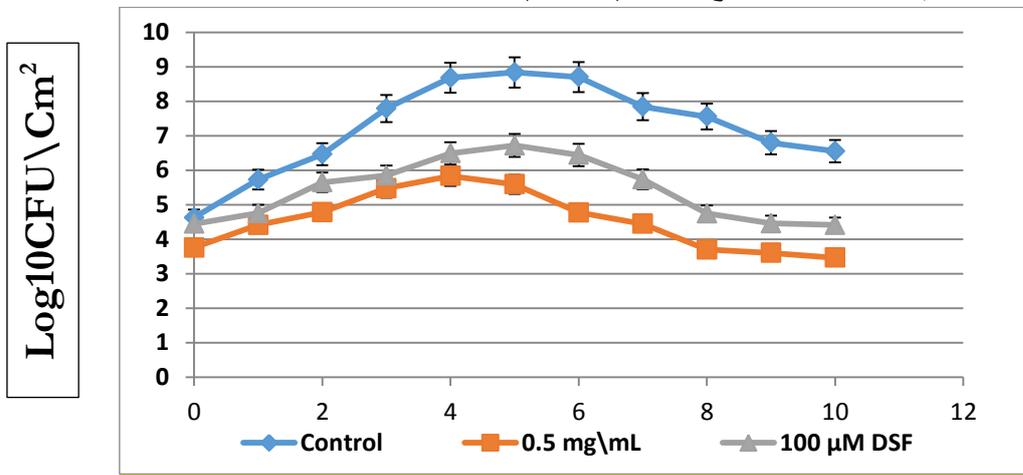
أتبعت طريقة Martinez وزملائه (2000)، حيث حُضرت الخلاصة النباتية لنبات القطن من خلال طحن 1g من الأنسجة النباتية للأوراق الفلقية للمعاملات المدروسة والمجمدة عند درجة حرارة (-20°C) بالطريقتين آنفة الذكر مع 4 mL من محلول الاستخلاص HCL buffer-Tris ذو حموضة pH=7 والمكون من (50mM Tris basic، 50mM NaCl، 5mM β-Mercaptoethanol، 1% PVP، و 0.01% Triton 100X). ثم نُقلت الخلاصة النباتية الخام بواسطة جهاز الطرد المركزي عند سرعة 16000 xg لمدة 15 دقيقة ودرجة حرارة 4°C. وأخذ القسم العلوي لنتائج التثليل وأُستخدمت الخلاصة النباتية الطازجة لدراسة فعالية أنزيم البيروكسيداز POD بهدف المقارنة بين الشاهد والنباتات المُعاملة، وحُضرت لكل عينة مدروسة ثلاثة مكررات.

3. الفعالية الأنزيمية لـ POD في خلاصة الأوراق الفلقية:

تم تقييم فعالية الـ POD في لكل مكرر من العينات المدروسة بشكل طيفي، حيث أُخذ 5 µL من الخلاصة الأنزيمية لكل مكرر من العينات المدروسة، وقيست الامتصاص للضوء عند طول موجة 470 nm، باستخدام محلول التفاعل والمكون من (0.01% غوياكول Guaiacol، 0.03% H₂O₂، 50mM Sodium Phosphate buffer، ودرجة حموضة pH=6.8، ثم قدر النشاط الكلي لأنزيم البيروكسيداز بـ nanoKatal لكل 1mg من تركيز البروتين الكلي في الأنسجة النباتية لكل مكرر من العينات النباتية المدروسة، حيث حُسب تركيز البروتينات الكلية للأوراق الفلقية للنباتات المدروسة بطريقة برادفور Bradford (1976)، وذلك من خلال تحضير عدة تراكيز معروفة الوزن من ألبومين مصّل البقر، وإنشاء معادلة خط مستقيم، ومن ثم حساب تركيز البروتينات الكلية في المعاملات بناءً على المعادلة الخطية.

النتائج والمناقشة :Result and Discussion

انخفاض نمو البكتيريا Xcm S101 في الأوراق الفلجية لنباتات الفطن المُعاملة مسبقاً بطريقة الحقن بإشارات عائلة الـ DSF. أظهرت النتائج (الشكل 1) أنّ النباتات التي حُقنت مسبقاً بالإشارة النقية الـ DSF بتركيز $100 \mu\text{M}$ أو بخلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 بتركيز 0.5 mg/mL قد انخفضت فيها النمو البكتيري بدءاً من الأيام الأولى من العدوى، حيث وصل نسبة الخفض في النمو لوغاريتمياً (2.19، 2.85) على التوالي مقارنة مع الشاهد بعد 4 أيام من العدوى الاصطناعية، واستمر النمو البكتيري بالانخفاض في المعاملات مقارنة مع الشاهد طيلة 10 أيام من العدوى. وتطابقت هذه النتائج مع حقن الأوراق الفلجية بمعلق حاوي على البكتيريا مع خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية الـ DSF، حيث أظهرت النتائج (الشكل 2) إلى انخفاض النمو البكتيري في الأوراق المُعاملة بالخلاصة أو الإشارة بدءاً من 24 ساعة بعد الحقن مقارنة مع الشاهد، حيث وصل نسبة انخفاض النمو البكتيري في الأوراق المحقونة بالخلاصة أو الإشارة النقية لوغاريتمياً إلى (3.6، 2.54) على التوالي بعد 4 أيام من الحقن مقارنة مع الشاهد (الشكل 2).



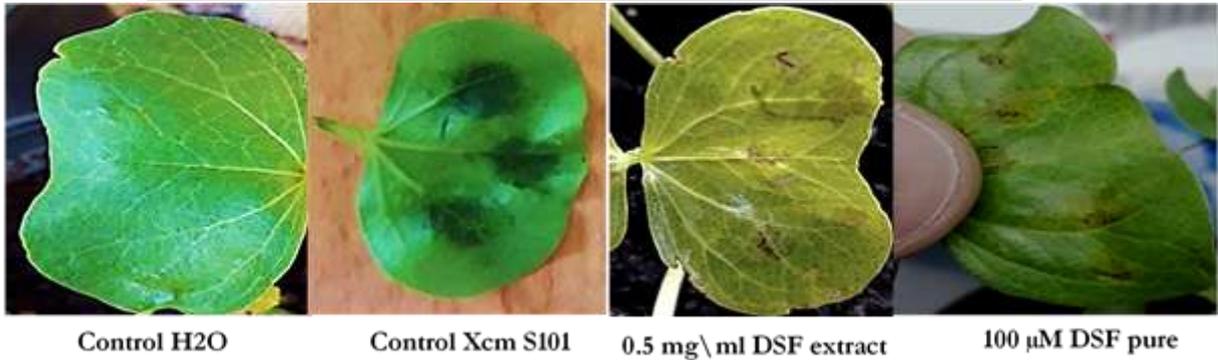
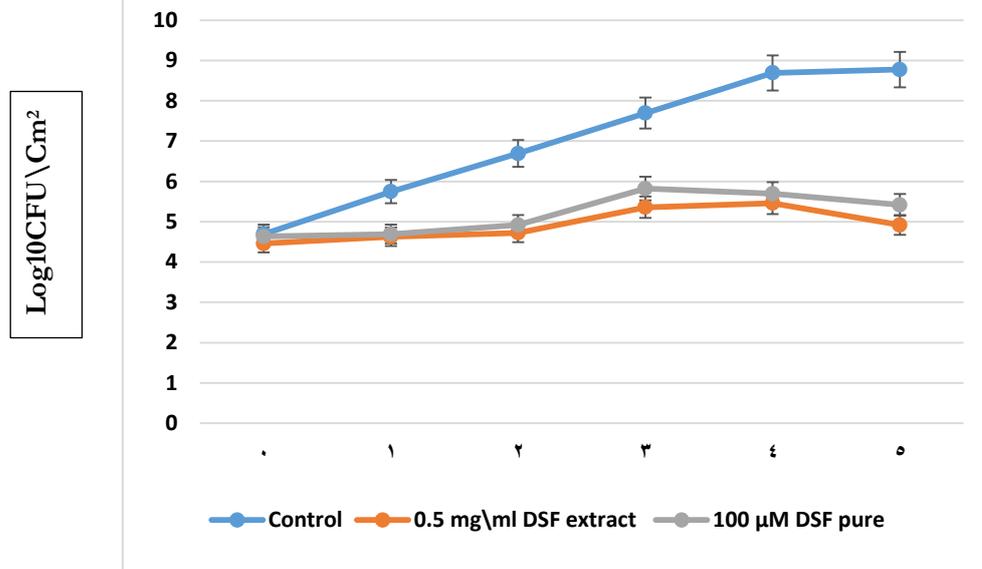
Control H2O

Control Xcm S101

0.5 mg/mL DSF extract

100 μM DSF pure

الشكل (1): A: التعداد البكتيري لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة لكل معاملة بالإضافة إلى الشاهد $\pm SD$. B: صورة تظهر تأثير الإشارة النقية و خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تطور البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلجية بعد 24 ساعة من الحقن، حيث انخفض تطور البكتيريا Xcm في الأوراق الفلجية المعاملة بهما.

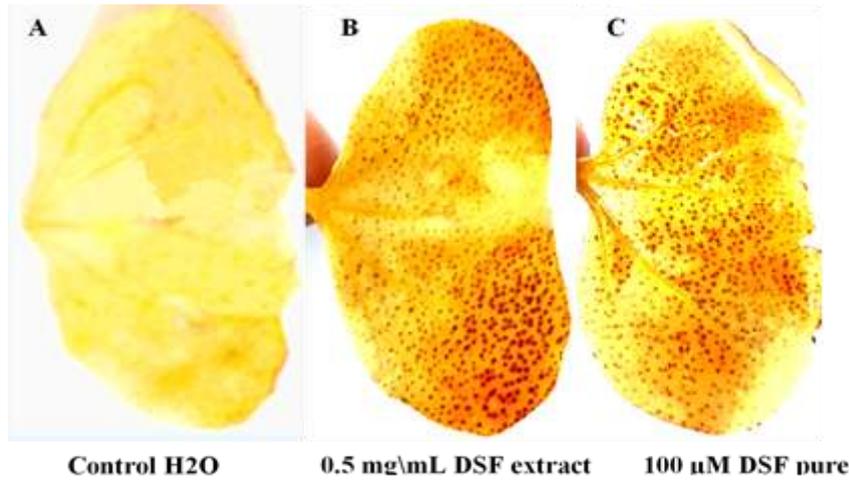


الشكل (2): A: التعداد البكتيري لمتوسط ثلاث مكررات مستقلة لكل معاملة بالإضافة إلى الشاهد \pm SD. B: صورة تظهر تأثير الإشارة النقية وخالصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF على تطور البكتيريا Xcm S101 في الأنسجة النباتية للأوراق الفلجية الناتج عن حقن الأوراق بمعلق حاوي على البكتيريا مع الخالصة أو الإشارة النقية مع بعض، حيث انخفض تطور البكتيريا Xcm S101 في الأوراق المعاملة بهما.

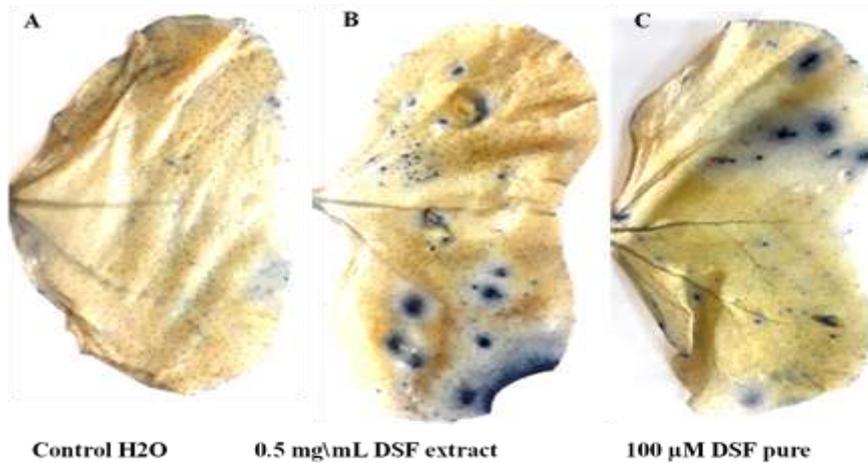
تراكم بيروكسيد الهيدروجين وتحفيز برنامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلجية لنبات القطن المعالجة مسبقاً عن طريق الحقن بإشارات عائلة الـ DSF.

أظهرت النتائج أن لمستخلص وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF دوراً في تنشيط إنتاج بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 والذي ظهر على شكل ترسبات بنية اللون ضمن الأوراق الفلجية المعاملة مقارنة مع الشاهد، وأن الأوراق الفلجية المعاملة بمستخلص وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF أظهرت ترسباً بيناً واضحاً أكثر من المعاملة بالإشارة النقية الـ DSF (الشكل 3)، أشارت الدراسات المرجعية إلى أن تراكم بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في الأنسجة النباتية يؤدي إلى تحريض ردود الفعل الدفاعية في النبات حيث تعمل كإشارات موضعية محلية تسبب في حدوث فرط الحساسية، والمترافق للموت الخلوي المبرمج، كما تعمل كإشارات قابلة للانتشار لتحريض تعبير العديد من

المورثات والتي يشارك بعضها في الدفاع عن النبات (Nafie وآخرون، 2011، 6)، كذلك أشارت دراسات أخرى إلى أن تراكم H_2O_2 في الأنسجة النباتية يؤثر سلباً على الكائن الممرض في أماكن غزوه، ويساهم في بناء وتقوية الجدار الخلوي من خلال زيادة ترسيب اللجنين والترابط التأكسدي للبروتينات الغنية بالهيدروكسي برولين، والمساهمة في تركيب الفيتوالكسين، ويعمل كمركب إشارة في تحريض المقاومة الجهازية في النبات، وإعاقة دخول الممرض والحد من انتشاره (Hathout وآخرون، 2010). كما أظهرت النتائج السابقة تحفّز برنامج الموت الخلوي المبرمج في الأوراق الفلقية المعاملة بمستخلص وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF من خلال تلون الخلايا الميتة بأزرق لكتوفينول تريبان مقارنة مع الشاهد الذي لم يظهر عليه تلون الخلايا النباتية باللون الأزرق (الشكل 4).



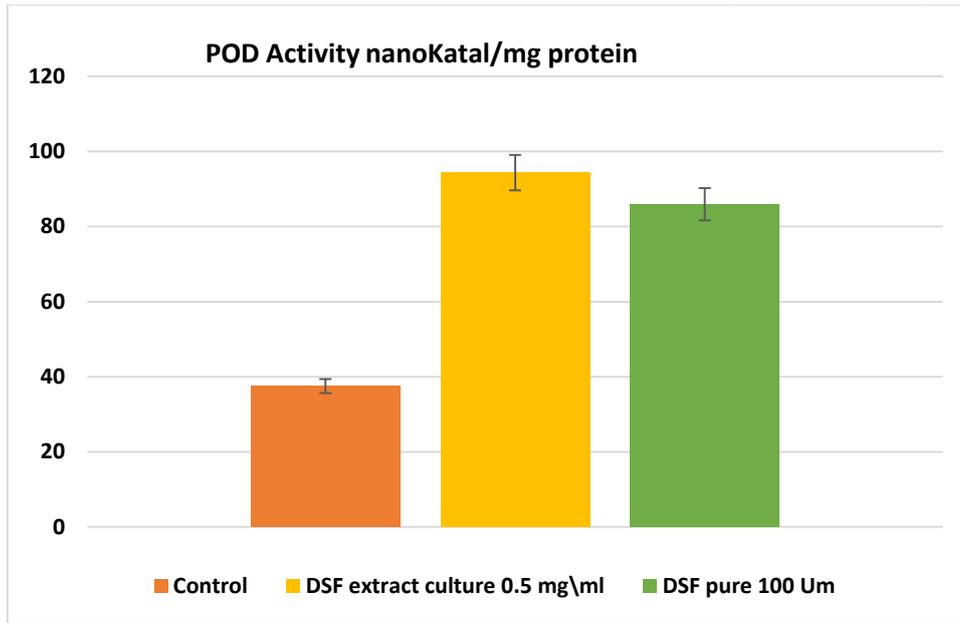
الشكل (3) إنتاج وتراكم بيروكسيد الهيدروجين في الأوراق الفلقية لنبات القطن بعمر 10 أيام، والتي حُقنت بخلصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF أو الإشارة النقية الـ DSF، حيث تدل النقاط الحمراء على تراكم بيروكسيد الهيدروجين.



الشكل (4): تأثير كل من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوي على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF على برنامج الموت الخلوي المبرمج، حيث تدل النقاط باللون الأزرق على الخلايا النباتية الميتة.

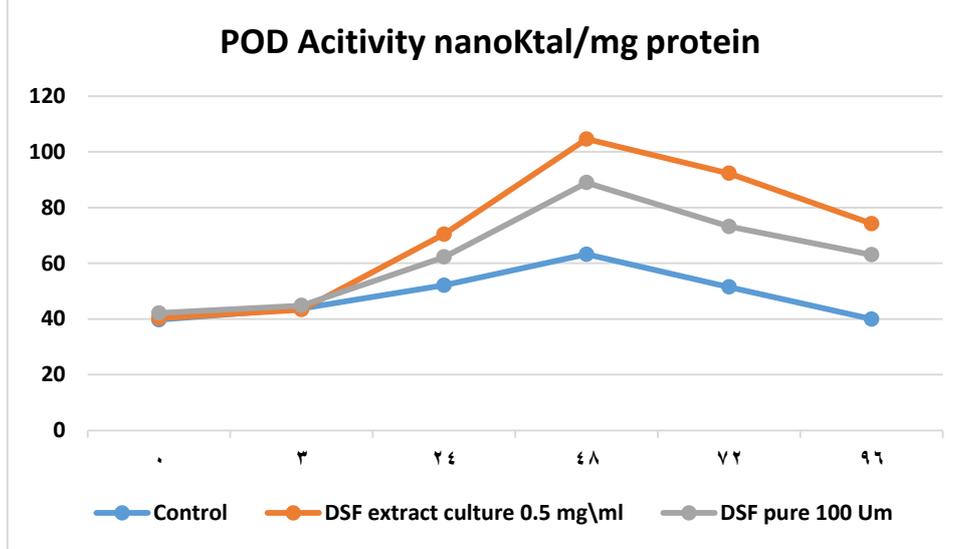
زيادة فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلجية لنباتات القطن المُعالجة مسبقاً عن طريق نقع البذور أو الحقن بإشارات عائلة الـ DSF.

أظهرت النتائج (الشكل 5) زيادة نشاط فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأنسجة النباتية للأوراق الفلجية بعمر 10 أيام والمُعاملة بذورها بكل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية الـ DSF. حيث بلغ (85.90، 94.32) nanKatal/mg على التوالي مقارنة مع الشاهد الذي بلغ 37.55 nanKatal/mg.



الشكل (5) تأثير نقع بذور القطن بكل من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة DSF والإشارة النقية DSF على الفعالية الكلية لأنزيم البيروكسيداز طيفياً للأوراق الفلجية بعمر 10 أيام.

وكذلك أظهرت النتائج (الشكل 6) زيادة في فعالية أنزيم البيروكسيداز في الأنسجة النباتية للأوراق الفلجية التي رُشت بالخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة DSF والإشارة النقية DSF حيث كان أقصى تركيز للأنزيم بعد 48 ساعة من الرش حيث بلغ (88.95، 104.62) nanKatal/mg على التوالي مقارنة مع الشاهد الذي بلغ 63.22 nanKatal/mg.



الشكل (6) تأثير رش الأوراق الفلغية بعمر 10 أيام لنباتات القطن بكل من خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF على نشاط الفعالية الكلية لأنزيم البيروكسيداز.

بينت النتائج السابقة أن خلاصة وسط زرع البكتيريا XcmS101 الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF دوراً هاماً في تخفيض القدرة الإراضية للبكتيريا ضمن النسيج النباتي من جهة، ومن جهة أخرى تأثيرها الإيجابي على تطور ردود الفعل الدفاعية عند النبات، حيث أدى وجود كل منهما بمستويات عالية في الأنسجة النباتية لنبات القطن إلى الحد من نمو وتطور البكتيريا Xcm S101، وتشابهت هذه النتائج مع الدراسات المرجعية حيث أشار Torres وآخرون (2007، 6) إلى أن وجود تراكيز عالية من إشارات عائلة الـ DSF بشكل مسبق في النبات العائل أدى إلى موت البكتيريا Xcc من خلال منعها في تشكيل البيوفيلم العامل الأساسي لبكتيريا الجنس *Xanthomonas* لإحداث المرض وانخفاض إنتاج الـ Exopolysaccaride (EPS) مما يجعل البكتيريا معرضة للعوامل غير المرغوب بها حوله، وكذلك تطابقت مع Lonsecu وآخرون (2016، 4) والذي أشار إلى وجود الإشارة الـ DSF أو الإشارة xfDSF بشكل مسبق في نبات العنب يؤدي إلى موت البكتيريا *Xylella fastidiosa* وتنشيط حركتها. ومن ناحية ثانية أدت معاملة نبات القطن بكل من الخلاصة البكتيرية الحاوية على إشارات عائلة الـ DSF والإشارة النقية DSF إلى تحريض ردود الفعل الدفاعية متمثلة بتراكم بيروكسيد الهيدروجين وتحفيز نظام الموت الخلوي المبرمج في الأنسجة النباتية للأوراق الفلغية، مما يدل على قدرتهما على تحريض المقاومة المستحثة في النبات، وكذلك أظهرت النتائج (الشكل 6، 7) دورهما في زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز في الأوراق الفلغية للنباتات المعاملة بذورها بهما أو الأوراق الفلغية التي رُشت بهما مقارنة مع الشاهد وهذا مؤشر على تحفيز كل من المقاومة الجهازية والمقاومة المستحثة في نبات القطن على التوالي، وتطابقت هذه النتائج مع الدراسات المرجعية التي أشارت إلى الإشارة الـ DSF بحد ذاتها قد تلعب دوراً في تنشيط ردود الفعل الدفاعية في النبات المعامل بها والتي تؤدي في النهاية إلى إضعاف كلاً من النمو البكتيري والتعبير الجيني لعوامل القدرة الإراضية (Kakkar وآخرون 2015، 9)، حيث أشار إلى الإشارة الـ DSF تعمل على تحفيز ردود الفعل المناعية في النبات متمثلة برد فعل مشابه لفرط الحساسية، وتراكم البروتينات المرتبطة بالعامل الممرض PR1، والمركبات الومضية المناعية، وتراكم بيروكسيد الهيدروجين، وتحفيز نظام الموت الخلوي المبرمج، كما أن معاملة نبات الزر بالإشارة الـ DSF أدى إلى انخفاض مرض اللفحة البكتيرية على

الرز Xoo، وذلك عند استخدام تراكيز أعلى من $20 \mu\text{M}$ من الإشارة DSF، بينما أشار Dow (2016، 13) إلى أنّ معاملة النبات بالإشارة الـ DSF بتراكيز منخفضة أقل من $20 \mu\text{M}$ تحفز الدفاعات الأولية عند النبات المعامل بها بطريقة مشابهة لعمل السياط البكتيرية Flagellin peptides (المحفز الميكروبي PAMP). كما أشارت الدراسات المرجعية إلى أن وجود إشارات عائلة الـ DSF بشكل مسبق في وسط نمو البكتيريا تجعل البكتيريا تعبر عن عوامل قدرتها الإراضية بشكل مبكر قبل وصول كثافتها العددية إلى المستوى المطلوب لاستحثاث الـ QS لإنتاج تلك العوامل، مما يساعد ذلك على تخفيف المقاومة الجهازية في النبات ضد الأعداد القليلة من البكتيريا والإنتاج المنخفض من عوامل القدرة الإراضية وهذا ما يعرف بتشويش العامل الممرض Pathogen Confusion (Dow، 2016)، وأشارت الدراسات المرجعية إلى 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 كجزء QS فيتم التعرف عليها من قبل النباتات بمسارات مشابهة لمسارات التعرف على الحموض الدهنية غير المشبعة، حيث تقوم DSF بتحفيز ردود الفعل المناعية الطبيعية في النبات (Bostock وآخرون، 2005، 6)، وأنّ 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 والميكروبات (Upchurch، 2008، 3؛ Kachroo وآخرون، 2001، 4، 2003، 5؛ Savchenko وآخرون، 2010، 6)، وإن الأحماض الدهنية الخارجية غير متوفرة بكثرة في النباتات، مثل حمض Eicosapentaenoic acid، وحمض Arachidonic acid، والتي تعتبر بمثابة محفزات قوية لإحداث الاستجابة الدفاعية في النباتات الباذنجانية (Bostock وآخرون، 1981، 3؛ Bostock وآخرون، 1992، 2؛ Knight وآخرون، 2001، 5)، حيث أشارت الدراسات الحديثة (Amruthesh وآخرون، 2005، 3) إلى أن ستة أحماض دهنية غير مشبعة وهي: حمض Docosaheptaenoic acid (DHA)، حمض Eicosa-pentaenoic acid (EPA)، حمض Arachidonic acid (AA)، وحمض linolenic acid، وحمض Linoleic acid، وحمض 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 القابلة للإصابة بهذه الأحماض، كما أظهرت النتائج زيادة نسبة الإنبات للبذور المعاملة كما زادت من صفاتها الانتاجية كما ونوعاً، حيث اقترح العلماء أن حالة عدم تشبع من النمط Cis هو هيكل حاسم مميز لنشاط هذه الأحماض الدهنية غير المشبعة في تحفيز الاستجابة الدفاعية في النباتات (Bostock وآخرون، 1981، 3؛ 1992، 4؛ Bostock، 2005، 1).

الاستنتاجات: Conclusions:

لعبت إشارات عائلة الـ DSF في خلاصة وسط زرع البكتيريا Xcm S101 والإشارة النقية الـ DSF دوراً سلبياً في نمو وتطور البكتيريا Xcm S101 إذ انخفض نموها وتطورها في الأنسجة النباتية للأوراق الفلجية لنبات القطن وانخفضت قدرتها الإراضية، وحرضت ردود الفعل الدفاعية في نبات القطن، مما يفسح لنا المجال في استخدام هذه الإشارات كعوامل مكافحة بيولوجية للبكتيريا المنتجة لها، ومحرضات للمقاومة في النباتات المعاملة بها.

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 القطن *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*. رسالة ماجستير، كلية الزراعة-جامعة دمشق، ص 1-62.
2. Alavi, P., Muller, H., Cardinale, M., Zachow, C., Sa´nchez, B., Martinez, J., Berg, G. (2013). The DSF Quorum Sensing System Controls the Positive Influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on Plants. PLOS ONE. Volume 8 | Issue 7 | DOI.10.1371/ journal.pone.0067103.
3. Amruthesh, K.N., Geetha, N.P., Jørgensen, H.J. L., de Neergaard, E., and Shetty, H. S. (2005). Unsaturated fatty acids from zoospores of *Sclerospora graminicola* induce resistance in pearl millet. European Journal of Plant Pathology .111: 125–137.doi.org /10.1007/s10658-004-1590-9.
4. Attoma, D., Sponari, M., Morelli, M., Giampetuzzi, A., Savino, V.N., Bisica, D., and Saldarelli, P. (2016). Exploiting pathogen confusion strategy to achieve *Xylella fastidiosa* biocontrol. Convegno Nazionle SIPaV. XXII(84-86).
5. Bautista, N.F., Núñez, J.A. D., Moreno, M. M., and Lobo, M.B. (2016). Plant Tissue Trypan Blue Staining during Phytopathogen Infection DOI:10.21769/BioProtoc.2078.
6. Bostock, R.M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. Annual Review of Phytopathology 43,545–580.DOI.10.1146/ annurev.phyto.41. 052002. 095505.
7. Bostock, R.M., Kuc, J.A., Laine, Ra.(1981). Eicosapentaenoic acid and arachidonic acid from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. Science 212,67-69. DOI.10.1126/science.212.4490.67.
8. Bostock, R.M., Yamamoto, H. D,Choi., Ricker, K.E.,Ward, B.L. (1992). Rapid stimulation of 5-lipoxygenase activity in potato by the fungal elicitor arachidonic. Plant physiology 100. 1448-1456. DOI.10.1104/pp.100.3.1448.
9. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*72, 248–254.doi.org/10.1016/003-2697(76) 90527-3.
10. Caicedo, J. C. Villamizar, S., and Ferro, J. A. (2017). Quorum Sensing, It's Role in Virulence and Symptomatology in Bacterial Citrus Canker. Doi /10.5772/66721.
11. 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 Cell*21: 1860-1873.DOI. 10.1105/tpc.109.066886.
12. Daudi, A., and O'Brien, J.A.(2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio Protoc.* 2012; 2(18). PMC4932902.
13. Deng, Y., Wu, J., Tao, F., and Zhang, L.H. (2011). Listening to a new language: DSF-based quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Chem. Rev.* 111, 160–173.DOI.org /10.1021/cr100354f.
14. Doughari, J.H. (2015). An Overview of Plant Immunity. *Plant Pathology and Microbiology* . ISSN: 2157-7471 JPPM, Volume 6 • Issue 11. DOI.10.4172/2157-7471.100 0322.
15. Dow, J.M. (2016). Diffusible signal factor- dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. *Journal Applied Microbiology*. Doi.org/ 10.1111/jam.13307.
16. Felix, G., and Boller, T.(2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* 278, 6201–6208. DOI.1-1074/jbc .M209880200.
17. Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999).Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18, 265–276. DOI.10.1046/j.1365-313x.100-.00265.x.

- 18.Hartman, G.L., Pawlowski, M.L., Chang, H.X., and Hill, C.B. (2016). Successful Technologies and Approaches Used to Develop and Manage Resistance against Crop Diseases and Pests. Emerging Technologies for Promoting Food Security. doi.org /10.1016/ B978-1-78242-335-5.0003.
- 19.Hathout, T.A., Felaifel, M.S., EL-Khallal, S.M., Abo-Ghalia, H.H., and Rabab, A.G. (2010). Biocontrol of Phaseolus Vulgaris Root Rot Using *Arbuscular Mycorrhizae*.J. Agric. Res. 88: 15-25. DOI.10.21608/ EJAR.2010.18-193.
- 20.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.
- 21.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.
- 22.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.
- 23.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.
- 24.Kachroo, P., Kachroo, A., Lapchyk, L., Hildebrand, D., Klessig, D.F.(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.DOI.10.1094/MPMI.2003.16.11.1022.
- 25.Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J., Klessig, D.F. (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98, 9448–9453.DOI.org/10.1073/pnas.151258398.
- 26.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.
- 27.Kunze, G., Robatzek, Z.C., Niehaus, S., Boller, K., and Felix, T. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. The Plant Cell 16, 3496–3507. doi.org/10.115/tpc.104.026765.
- 28.Lonescu, M., Yokota, K., Antonova, E., Garcia, A., Beaulieu, E., Hayes, T., and Lindow, S.E.(2016). Promiscuous Diffusible Signal Factor Production and Responsiveness of the *Xylella fastidiosa* Rpf System. American Society for Microbiology. VOL.7, Issue 4, 054-16.
- 29.Liu, F., Zhao, Q., Jia, Z., Song, C., Huang, Y., Ma, H., and Song, S. (2020). N-3-oxo-oc-tanoyl-homoserine lactone mediated priming of resistance to *Pseudomonas syringae* required the salicylic acid signaling pathway in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology.doi.prg/10.1186/s12870-019-228-6.
- 30.Martinez, C., Baccou , J., Bresson. E., Baissac, Y., Daniel, J., Jalloul, A., Montillet, J., Geiger, J., Assigbetsé, K., and Nicole, M. (2000). Salicylic Acid mediated by the Oxidative Burst Is a Key Molecule in Local and Systemic Responses of cotton Challenged by an Avirulent Race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. American Society of Plant Physiologists. 122, 757–766.DOI.10.114/pp.122.3.757.

31. Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., Bauer, W.D. (2003). Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl AcadSci USA* 100:1444–1449. doi:10.1073/pnas .262672599.
32. Moshynets, O.V., Babenko, L., Rogalsky, S., Lungin, O.S., Foster, J., Kosakivska, I., Potters, G., Spiers, A. J. (2019). Priming winter wheat seeds with the bacterial quorum sensing signal N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) shows potential to improve plant growth and seed yield. *PLoS ONE* 14(2): e0209460. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0209460>.
33. Nafie, E., Hathout, T., and Al Mokadem, Al. S. (2011). Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. *Braz. J. Plant Physiol.*, 23(2): 161-174. DOI.org /10.1590/ S1677-04202011000200008.
34. Newman, M.A., Lahaye, E.R., Parr, A., Daniels, M.J., Dow, J.M. (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal* 29, 487–495. DOI.10.1046/j.0960-7412.2001.00233x.
35. Pierce disease and other designated pests and diseases of winegrapes. (2015). California Department of food and agriculture. Sacramento. CA 95814.
36. 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.
37. Rigano, L.A., Payette, C., Brouillard, G., Marano, M.R., Abramowicz, L., Torres, P.S., Yun, M., Castagnaro, A.P., Oirdi, M.E., Dufour, V., Malamud, F., Dow, J.M., Bouarab, K., and Vojnov, A.A. (2007). Bacterial cyclic beta-(1,2)-glucan acts in systemic suppression of plant immune responses. *Plant Cell* 19: 2077–2089. DOI.10.1105/tpc.106.047944.
38. Savchenko, T., Walley, J.W., Chehab, E.W., Xiao, Y., Kaspi, R., Pye, M.F., Mohamed, M.E., Lazarus, C.M., Bostock, R.M., and Dehesh, K. (2010). Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks. *The Plant Cell* 22, 3193–205. DOI.10.1105/tpc.110.073858.
39. Schikora, A., Schenk, S.T., and Hartmann, A. (2016). Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol Biol.* (6):605-12. doi: 10.1007/s11103-016-0457-8.
40. Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman M.A., and Parrilli, M. (2005). The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 33660–33668. DOI.10.1074/jbc.M506254200.
41. Torres, P.S., Malamud, F., Rigano, L.A., Russo, D.M., Marano, M.R., Castagnaro, A.P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M., and Vojnov, A.A. (2007). Controlled synthesis of the DSF cell–cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environmental Microbiology*. 9(8), 2101–2109. DOI. 10.1111/j.1462-2920.2007.01332.x.
42. Upchurch, R.G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* 30, 967–977. DOI.10.1007/s10529-008-9639-z.
43. vonRad, U. (2008). Response of *Arabidopsis thaliana* to N-hexanoyl-DL-homo-serine lactone, a bacterial quorum-sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* 229:73–85. doi:10.1007/s00425-008-0811-4.
44. 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.
45. Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005). Quorum Sensing Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Molecular Biology*. p21:319–46. DOI.10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.
46. Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., and Stead, D.E. (1996). Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of Plant Pathology*, 75(9):721-763; 10 pp.

-
- 47.Zhou, L., Wang, X.Y., Zhang, W., Sun, S., and He, Y.W. (2017). Extraction, Purification and Quantification of Diffusible Signal Factor Family Quorum-sensing Signal Molecules in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Bio Protoc.* 207(6): e2190. Doi: 1021769/BioProtoc.2190.
- 48.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.