Plant Pathogenic Bacteria: Struggling for Survival State – of - the - Art Article

الكفاح والمثابره فى البكتيريا الممرضة للنبات من أجل البقاء

د. محمد عبد الرحمن الوكيل
أستاذ أمراض النبات المتفرغ
جامعة المنصورة
mwakil.net
E-mail: mawakil@mans.edu.eg
April 2019

تقديم:

عندما تصاب النباتات بمرض بكتيرى فقد يتسبب عنه أضرار بالغه الخطوره تأتى على المحصول بكامله وقد يتحدد تأثيرها فى أضرار محدوده وغير مؤثره إقتصادياً على الإنتاج. وفى آخر الإحصاءات المتاحه قدرت الآثار السلبية للامراض البكتيريه على المستوى العالمى بما يعادل المليار دولار سنوياً لذلك كان من الضرورى تفهم سلوك البكتيريا فى معيشتها وطرق تحايلها من أجل البقاء وقدرتها على إحداث الإصابه وتستعرض هذه المقاله الكيفيه التى تلجأ إليها البكتيريا لكى تستمر حيه فى البيئه المحيطه قادره على إصابه عوائلها النباتيه.

الوسائل التى تلجأ إليها البكتيريا لحماية نفسها من الظروف البيئيه التى تتعرض إليها أثناء نموها وتكاثرها

تلجأ البكتيريا الممرضه للنبات إلى عدة طرق لتطوير نفسها إذا ما تعرضت لتاثير مواد كيماويه سامه وذلك بطردها خارج خلاياها بإستخدام طلمبات التدفق **Efflux pumps** الموجوده بداخل خلاياها (مع الوضع فى الإعتبار أن البكتيريا الموجبة لجرام G^+ والتى تحدث أمراضاً نباتيه مثل البكتيره ***Clavibacter michigaensis*** تنفرد بتكوين الجراثيم كوسيله للحمايه من المؤثرات البيئيه الخارجيه وقد تلجأ البكتيريا إلى توظيف بروتيناتها لتغير فسيولوجيه النبات لتثبيط ميكانيكية دفاعه عن نفسه.

قد تلجأ البكتيريا أيضا إلى تكوين **biofilms** أو إنتاج خلايا بكتيريه مثابره **persister cells** قادره على تحمل تأثير المبيدات البكتيريه والتى من أهمها المضادات الحيويه ومركبات النحاس. كما أن للبكتيريا نظامين من نظم المكافحه من أجل البقاء ففى النظام الأول تكون البكتيريا مايطلق عليه بالخلايا المثابره أو **persister cells** وفى النظام الثانى تكون سلالات مقاومه **Resistant strains** يتم فيها غلق ممرات التفاعل بينها وبين المضاد الحيوى فقط ليقتصر تأثيره على تحطيمه لبعض أجزاء من الخليه البكتيريه. أما فى **persister cells** فتقوم البكتيريا بخفض نشاطها الأيضى إلى أدنى حد ممكن حتى لا تمكن المضاد الحيوى من قتل الخلايا فلا يصل تأثيره إلا لبعض الأجزاء الغير نشطه من الخليه. ومن ناحية أخرى فإن البكتيريا يمكنها إختيار النظام المناسب لها حسب كل حالة (**Persister cell formation or Resistant strains**) وعادة ما تبدأ فى ذلك بإنتاج سلالات مقاومه فإذا فشلت فتلجأ إلى إستخدام النظام البديل وهو إنتاج **Persister cells** والذى يمكن إعتباره وسيله ناجحه لحمايه النوع البكتيرى من الإنقراض.

تعتمد المثابره Persistence على ميكانيكيه وراثيه تحدث داخل خلايا البكتيريا تؤدى إلى وصولها إلى طور ساكن يتحمل الظروف البيئيه الخارجيه القاسيه وبعدها تلجأ إلى نظام مكمل تستخدمه لإستئناف نموها عندما تتحسن الظروف البيئيه أى أنه عندما يزول تأثير المضاد الحيوى فإن ال Persister cells تستأنف نموها وتنتج مجتمع من الخلايا لة نفس الصفات الوراثيه وهنا تصبح فاعليه المضادات الحيويه والمدى الزمنى لتأثيرها محل جدل.

تتكون ال Persister cells إما بطريقه عشوائيه أو التعرض لظروف بيئيه معينه ، ومن أهم العوامل المؤديه إلى ظهور هذا النوع من الخلايا هى الأكسده Oxidative Stress، التجويع Starvation، المضادات الحيويه antibiotics، pH، تأثير النحاس Copper stress وعلى ذلك فقد يُفسر تمرد العديد من الخلايا البكتيريه على المضادات الحيويه إلى إنتاجها لهذا النوع من الخلايا (Persister cells)

ونظراً لمحدودية الأبحاث التى أجريت فى هذا الشأن على البكتيريا الممرضه للنباتات مع توفر مثيلتها التى أجريت على الإنسان والحيوان فإن الإستعانه بنتائج هذه التجارب قد يحاكى مايحدث فى الخلايا البكتيريه الممرضه للنبات وقد وجد فى الجروح التى تصيب الإنسان خلايا مثابره Persister cells مختبأه فى ال biofilms أو فى مشكاه من نوع آخر (Protective niches) وقد يكون هذا هو السبب فى فشل الكثير من صور العلاج الكيماوى فى التخلص من البكتيريا الممرضه للنبات كونها تتمكن بعد زوال تأثير المضاد الحيوى من إعادة تشكيل نفسها وتكاثرها لتعاود مهاجمة النبات مرة اخرى وإحداث الإصابه به.

Occurance of Persister Cells in Plant Pathogenic Bacteria

تكون الخلايا البكتيريه المثابره فى البكتيريا الممرضه للنبات

للبكتيريا الممرضه للنبات المقدره على إنتاج طرز بكتيريه ساكنه 2 dormant phynotypes يطلق على الطراز الأول الطراز الحى وبالرغم من هذه التسمية فإنة لايمكن تنميته معملياً Viable but not-Culturable Cells (VBNC) أما الطراز الثانى فهو الطراز المثابر Persister state وفية تعاود البكتيريا نشاطها بعد زوال التأثير القاسى الذى تعرضت له أثناء نموها.

وبالرجوع إلى النوع الأول VBNC فلم يسجل لوقت قريب قدرته على النمو بعد زوال المؤثر كما فى الطراز الثانى لذلك يطلق علية إسم Dormant phenotype إلا أنة قد أشار البعض مؤخراً إمكانية معاودة نشاطه مما أجبر الباحثين على إدماج النوعين فى مسمى واحد وهو Persister cells كأسلوب للمثابره من أجل بقاء النوع.

وتنطرق فى ذلك إلى سلوك بعض الأنواع البكتيريه الهامه لإنتاج ال Persister cells.

Case study (1) *Erwinia amylovora*

(syn: *micrococcus amylovorus, Bacillus amylovorus*)

لهذه البكتيريا أهمية إقتصاديه وتاريخيه كونها أول بكتيره تسجل كأحد المسببات المرضيه للنبات على يد توماس بريل Thomas Burrill فى عام 1878م حيث كان يعمل أستاذاً للنبات بجامعة الينوى الأمريكيه وهو أحد تلاميذ لويس باستير.

تنتشر هذه البكتيره من نبات لآخر ومن منطقه جغرافيه لأخرى عن طريق الحشرات التى تزور الأزهار الحامله لها وتعمل الرياح على نقل الإفرازات اللزجة لهذه البكتيره بعد جفافها ولمسافات بعيده.

تصاب النباتات والأشجار التابعه للعائله الورديه بهذه البكتيريا شامله فى ذلك نباتات الزينه والشجيرات ولكن يقع تأثيرها الاكبر على أشجار الفاكهه خاصه الكمثرى والتفاح.

تستطيع هذه البكتيره المعيشه فى مدى واسع من درجات الحراره يتباين بين 4- 37م° إضافة إلى تواجدها على النباتات بكثره فى الأعضاء التكاثريه فى الأزهار فى صوره حره Epiphytic كما تتحمل هذه البكتيريا خلال دوره حياتها الظروف البيئيه القاسيه منها نقص الغذاء الشديد. أما عن التحولات الفسيولوجيه بها فقد تكون مرتبطه بدرجات حراره البيئه المحيطه.

وقد سجلت أحد التجارب مقدرة هذه البكتيريا على البقاء بعد تعرضها للتجويع لمدة 122 يوم فى درجات حراره تتباين بين 4-28م° وبعد هذه الفتره من الكفاح أمكن تنميتها على بيئة صلبه فى درجة حراره 14م° كما أثبتت التجارب مقدره هذه البكتيريا على البقاء حيه فى الأنسجه المصابه من سيقان الأشجار التى ظهر عليها المرض بدرجه محدوده حتى تحسنت الظروف البيئيه وتمكنت بعد ذلك من التكاثر والإنتشار من جديد.

ومن الملاحظ انه عندما تتعرض هذه البكتيريا *E. amylovora* لحدوث عجز من التغذيه فإنها تبدأ فى تقسية نفسها من أجل البقاء.

وعلى المستوى الجزيئى فقد وجد أن عملية التجويع Starvation فى هذه البكتيره له صله مباشره بعمليات الأكسده Oxidative stress كونها تحتوى على جينين 2Genes لإنتاج إنزيم الكتاليز(kat A Kat G) and فإذا فقد الثانى Kat G فإن ذلك يدفع البكتيره وبسرعه إلى الدخول فى عملية Persistance بالرغم من إمكانية نموها على البيئه الصلبه وبشكل طبيعى. ومما يؤيد ذلك أن زيادة تركيز الكتاليز سواء خلايا البكتيره ذاتياً أو بعد إضافتة إلى البيئه الصلبه فإن ذلك يدفعها إلى النمو وبشكل ملحوظ وبذلك يثبت أن إنزيم الكتاليز يشارك فى المحافظه على مقدره هذه البكتيريا على النمو معملياً على البيئة الصلبه.

تعتمد المقاومه الكيماويه لهذه البكتيره على المضادات الحيويه وأيضاً على مركبات النحاس وقد أثبتت التجارب مقدره مركبات النحاس Cupric compounds على دفع هذه البكتيره لتكوين خلايا مثابره Persister cells وذلك تبعاً إلى التركيز المستخدم منه فى المقاومه. كما ثبت أيضاً أن أكثر الطرق فاعليه لتكوين هذا النوع من الخلايا هو تمريرها فى خلايا العائل ومن ناحيه أخرى فإن التضارب فى نتائج المقاومه الكيماويه لهذه البكتيره وتعارض النتائج المعمليه للمقاومه مع النتائج الحقليه يشير إلى أن مقاومه مرض اللفحه الناريه فى الكمثرى والتفاح عمليه معقده للغايه.

ولا تتوقف نتائج هذه الدراسه Case study والخاصه بظاهره تكوين الخلايا البكتيريه المثابره Persister cells فى البكتيره *E. amylovora* عند تكوينها خلايا مثابره وعدم القدره على زراعتها معملياً وهى واقعه تحت تأثير هذه الظروف البيئيه القاسيه بل يمتد إلى حمل الثمار أثناء الشحن بهذه الخلايا وعدم تمكن إدارت

الحجر الزراعى من إكتشاف وجود هذه الأطوار الساكنه مما يساعد على إنتشارها حول العالم من خلال التجاره البينيه.

Case study (2) *Ralstonia solanacearum*

(syn *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholdaria solanacearum*)

تصيب هذه البكتيره العديد من النباتات مسببه ذبولها وحدوث فقد كبير فى المحصول. كما أنها واحده من أهم المسببات المرضية المدمره للمحاصيل خاصة الطماطم- البطاطس- الموز وإلى الأن فإنة لم يتم إكتشاف أسلوب فعال لمقاومتها أو كيماويات مؤثره تستخدم فى القضاء على هذا المرض.

تعيش هذه البكتيره فى التربه وتنتشر لتصيب النباتات عن طريق الجذور مؤديه إلى موتها عقب توغلها فى الجهاز الوعائى للنبات حيث تتحرر البكتيره مره أخرى فى التربة إنتظاراً لعائل آخر لتصيبه. كما ثبت ان هذه البكتيره تدخل طور المثابره Persister state فى التربة المعقمه مع إحتفاظها بقدرتها المرضيه فى الوقت الذى لايمكن معه عزل هذه البكتيريا على بيئه صناعيه ومع هذا فإن أعراض المرض تظهر على النباتات بعد ذلك وهذا يشير إلى أن ال Persister cells يمكنها أن تنشط وتظل محتفظه بقدرتها المرضيه حتى بعد دخولها فى Persister state ويمكن تفسير تلك الظاهره بأن الريزوسفير ربما أنه يُكون بيئه منشطه لإعادة نمو البكتيره وزراعتها على بيئه صناعيه. إلا أن تفاصيل ذلك مازالت غير معروفه بدقه وتحتاج إلى مزيد من الدراسه كما أن هذه الحاله هى أول تسجيل يوضح مقدره البكتيريا الممرضه للنبات لإعاده نشاطها.

تعمل درجات الحراره المنخفضه أيضاً على دخول هذه البكتيريا فى طور المثابره Persister state والبقاء فى هذه البيئه الخشنه إستعداداً لنموها بطريقه طبيعيه إذا ما توفرت الظروف البيئيه الغنيه بالغذاء.

ومن المثير للإهتمام أن البكتيره *R. solanacearum* عندما تتعرض للبروده يمكنها النشاط مره أخرى عند إضافه إنزيم الكتاليز لها كما هو الحال فى حالة البكتيره *E. amylovora* السابق الإشاره إليها وتتفق هذه النتائج مع مايحدث فى باقى الكائنات الدقيقه من حيث المقدره على علاج الخلايا البكتيريه من أثر المواد السامه وأيضا لتأثير عمليات الأكسده وقد ثبت أن المواد الكيماويه السامه مثل المبيدات هى أهم عوامل تحفيز إنتاج المثيرات Persister cells

ومن حيث أن مركبات النحاس Cupric compounds تستخدم على نطاق واسع كمبيدات بكتيريه وأنها تقتل معظم الخلايا البكتيريه ل *R. solanacearum* إلا أن الخلايا المتبقيه تدخل طور المثابره Persister state بنسبه تصل إلى 99.9% من هذه الخلايا الحيه المتبقيه فى خلال أسبوعين كما أنها تصل الى 100% عندما يستخدم النحاس بنسبه 500 µM.

وقد وجد أيضاً أن هذه البكتيره *R. solanacearum* تقاوم بشده تأثير النحاس وذلك بزياده نسبه DNA فى الخليه وخفض نسبه RNA إلى مستوى يصعب تقديره فى خلال 24ساعة من إضافه النحاس وفى ذات الوقت وجد أن المتبقيات من النحاس فى التربه ربما تكون أحد الأسباب الطبيعيه لتكون الخلايا المثابره Persister cells فى الطبيعه.

ومن النتائج العلميه المثيره أيضاً فى هذا المجال هو أن هذه البكتيره تكون Persister cells وهى مازالت داخل العائل وأثناء تطور المرض خاصه عند النقص المستمر فى المواد الغذائيه المتاحه، وبالرغم من أن *R. solanacearum* تدخل إلى Persister state بدرجات متباينه خلال مرحله الإصابه وبنسب قد تصل إلى 99 %. وهذه النتائج تشير إلى أن المسبب المرضى يجهز نفسه لتكوين Persister cells كطور من أطوار الحمايه حتى قبل أن يصل إلى التربه.

Case study3: *Xylella fastidiosa*

تعيش هذه البكتيره فى الأوعيه الخشبيه للنباتات المصابه وأيضاً فى القناه الهضميه لحشرات نطاطات الأوراق Sharpshooter insects والتى يمكنها نقل البكتيريا مباشره إلى أوعيه الخشب فى العائل النباتى وتشترك هذه البكتيره مع العديد من الأمراض النباتيه فى التأثير الإقتصادى على المستوى العالمى فى الموالح والعنب والخوخ والبرقوق والزيتون واللوز والقهوه.

تتكاثر هذه البكتيريا أيضاً فى الحشائش دون أن تحدث لها إصابات وبذلك تعتبر مجرد ناقل للبكتيريا لنشرها أما عن الأعراض التى تحدثها فهى إصفرار الأوراق Leaf chlorosis وإحتراق حواف الاوراق Marginal Scorching أو حدوث تقزم Dwarfing.

وعن ميكانيكيه الإصابه فتتم عن طريق إستعمار الجهاز الوعائى للنبات Systemic colonization عن طريق تكاثرها وحركتها وما يتبع ذلك من تكوين biofilms تسد أوعيه الخشب وتعوق حركه المياه والمواد الغذائيه الخام كما أنها فى ذات الوقت هامه للحشرات والتى تستطيع نقلها إلى نباتات أخرى لتصيبها بالإضافه إلى أن وجود خلايا البكتيريا فى biofilm يعمل على زياده مقاومتها للمضادات الحيويه وزياده قدرتها على تكوين Persister cells ولقد كان أول دليل على تكوين Persister cells فى هذه البكتيريا عندما تعرض ال biofilm الخاص بها إلى نسبه عاليه من النحاس. وقد لوحظ أنه بعد معامله هذه البكتيره بتركيز مثبط من النحاس فإن الخلايا ظلت حامله لل RNA مع إستمرار الجينات فى نشاطها مما يشير إلى قيامها بتكوين خلايا مثابره Persister cells.

وقد تأكدت هذه النتائج أيضاً بتكوين هذه البكتيره (*X. fastidiosa*) لخلايا مثابره Persister cells عندما عوملت بتركيزات مثبطه من النحاس والمضاد الحيوى تتراسيكلين حيث لم تتعدى نسبه Survival rate عن 0.05% للخلايا التى نمت فى هذه الظروف القاسيه.

وعليه فقد أثبتت الأبحاث أن للبكتيره *X. fastidiosa* المقدره على تكوين خلايا مثابره Persister cells تحت الظروف البيئيه العاديه للنمو وأيضاً تحت تأثير المضادات الميكروبيه وتشير بذلك إلى خطوره هذه الخلايا (Persister cells) على الزراعه. كون أن المركبات المضاده للبكتيريا تفشل فى القضاء على كل الخلايا البكتيريه مما يسمح لها بالنمو بعد ذلك وإحداث المرض بعد فتره زمنيه تختلف حسب الظروف البيئيه المحيطه.

Case study 4: *Xanthomonas* spp

تمثل هذه المجموعه أكثر الأجناس البكتيريه التى معظم المحاصيل الاقتصاديه مثل الموالح- الطماطم- القطن – الأرز- البقوليات – العنب والصليبيات وغيرها.

تتواجد هذه البكتيريا فى كافه أنحاء العالم وتنتشر بواسطه الأمطار – الرياح – أدوات الزراعة الملوثه أما مقاومتها فتتركز فى إستخدام مركبات النحاس بالرغم من محدوديه تأثيرها على البكتيريا وأضرارها للتربة والنبات وأكثر من ذلك فإن استخدامها وكما سبق القول يدفع البكتيريا من هذه الأنواع الى تكوين خلايا مثابره Persister cells لتصبح مصدر تهديد للزراعات القادمه.

ومن الأمثله على ذلك البكتيره *Xanthomonas campestris* pv *campestris* المسببه للعفن الأسود فى الصليبيات المنتشر فى كافة أنحاء العالم والتى تدخل فى حالة Persister state بعد يومين من تنميتها فى بيئة محتويه على كبريتات النحاس وتتكرر هذه النتائج مع البكتيره *X. citri* subsp *citri* والتى ليس لها أسلوب للعلاج سوى مركبات النحاس حيث تؤدى المعامله به الى ظهور خلايا مثابره Persister cells وبالنظر الى ظهور سلالات مقاومه للمعامله بمركبات النحاس فليست هذه هى السلبيه الوحيده لمركبات النحاس كون هذه الدراسه تمت على عدد محدود من البكتيريا الا أنه لابد أن هناك أنواع أخرى من *Xanthomonas* لها القدره على Persistence فى هذا الجنس.

Case study 5 : *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

تسبب هذه البكتيره مرض التقرح فى الطماطم وتنتشر من خلال البذور مسببة فقد إقتصادى كبير فى المحصول. هذه البكتيره هى أول بكتيره موجبة لجرام G^+ يُدرس سلوكها تحت مؤثرات بيئيه مختلفه من أجل تكوينها لخلايا مثابره Persister cells وعن مقاومتها فتتبع كثير من البلدان نفس النظام المتبع فى مقاومه مرض اللفحة الناريه فى الكمثرى Fire blight الذى تسببه البكتيريا *E. amylovora* وذلك بإستخدام المضادات الحيويه بالرغم من أن مركبات النحاس هى الأكثر إنتشاراً فى هذا المجال وكباقى البكتيريا السابق دراستها فان هذه البكتيريا تظل فتره من الزمن تصل لأكثر من الشهر فى وضع لا يؤهلها للنموعلى البيئة الصناعيه فى وجود مركبات النحاس حتى بتركيز منخفض يتأرجح حول 0.05µM وبالرغم من أن هذه الخلايا تستطيع إسترجاع قدرتها على النمو على البيئه الصناعية بعد ذلك إلا أنها لا تسبب أعراضاً على نباتات الطماطم عند إستخدمها فى تلقيح البادرات مما يضع علامات إستفهام حول هذه الظاهره التى تحتاج الى مزيد من الدراسه والبحث.

Case study 6: *Psedomonas syringae*

تتواجد هذه البكتيره فى كافه أنحاء العالم تعيش حره على سطح النباتات epiphytic وهى بكتيره إنتهازيه opportunistic ويدخل 75% من هذه البكتيره فى طور عدم المقدره على النمو على البيئه الصلبه والمسمى culturable state حتى بعد حوالى 80 ساعه من إصابه البقوليات وذلك لنقص الغذاء starvation حتى ولو كانت الخلايا حيه وقد أكتشف فيما بعد مركب فينولى يسمى acetosyringone فى

النباتات ومصنف كمضاد أكسده وفى وجوده ينخفض تعداد الخلايا بدرجة بالغه تصل 99% مما يدفعها لتكوين خلايا مثابره Persister cells وهذه تعطل تخليق البروتين المرتبط بالقدره المرضيه المعروف ب

Type III secretion system وكذلك ال Phytotoxins.

Genetic Mechanisms for induce persister cells

ميكانيكيه تكوين خلايا مثابره

تتشابه طريقه تكوين خلايا مثابره فى كل أنواع البكتيريا المسببه لأمراض النبات فيما يختص بطريقه معيشتها كطريقه للمحافظه على النوع وعلى أى حال فان تفسير هذه الميكانيكيه على المستوى الجزيئى مازالت ولحد كبير غير مفهومه كما أن الدراسات الوراثيه والفسيولوجيه على الخلايا المثابره Persister cells فى البكتيريا المسببه لأمراض النبات غير كافيه وأن الدراسات التى أجريت على تكوين الخلايا المثابره من أجل تفهم ميكانيكية حدوث ذلك على المستوى الجزيئى تتشابهه جميعها.

وعلى أى حال فان تكوين الخلايا المثابره Persister cells قد تتكون بطرق مختلفه وهذه تحتاج الى مزيد من الدراسه.

Implication of Persister cells in Agriculture Economy and Human health

تورط الخلايا المثابره فى التأثير السلبى للإقتصاد لزراعى

كان لإكتشاف قدره البكتيريا على تكوين Persister cells حدوث مخاوف كثيره على صحه الانسان فى كافه أنحاء العالم.

فمقاومه البكتيريا ترجع إلى تحولات وراثيه مثل حدوث الطفرات وأيضاً إنتقال الجينات الطرفيه Lateral gene transfer والتى تطور مقدره البكتيريا على البقاء تحت تركيزات عاليه من مضادات الميكروبات كما أن إستمرار حدوث العدوى يسبب درجة عاليه من المرض يؤدى إلى القضاء على المحصول وعدم المقدره على السيطره على الإصابه بالوسائل المتاحه .

وبالرغم من ذلك فإن ال Persister cells لا تعتمد على التحولات الوراثيه فانه على المستوى الجزيئى فإن هناك علاقه بين تكوين الخلايا المثابره والمقاومه من أجل تطوير ونشر السلالات المقاومه والتى تتكون عقب نهوض Persister cells من كبوتها وبناء على ذلك فإن حدوث المناعه فى البكتيريا وتكوين الخلايا المثابره فى مجال أمراض النبات البكتيريه قد يكون هو السبب فى عدم النجاح الكامل لبرامج المقاومه الكيماويه للأمراض البكتيريه بما فى ذلك إستخدام الأشعه فوق البنفسجيه- درجات الحراره- الجفاف – رد فعل النبات والمركبات الكيماويه القاتله للبكتيريا وربما تكون هذه التحولات سبباً فى حدوث الكوراث المفاجئه فى المحاصيل بالرغم من إستعمال مضادات الميكروبات وطرق الحماية الأخرى.

مراجع

- **Paula, M.M Martins *et al*, 2018 Doi: 10.3389 /finicb.2018.01099.**
- **مواقع علميه متنوعه**
- **On line mawkil.net, fact sheets.**