مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد ٤٠ العدد ٤ (٢٠٢٥): ١٦٣-١٧٦

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 40 No.4 (2025): 163-174

عزل بكتيريا *Citrobacter braakii* الجذرية محفزة لنمو النبات (PGPR) من المحيط الجذري للنباتات النجيلية

علي محمد عثمان[1*] رياض بلديه[2] محمود أبو غرة[3]

[1*] طالب دراسات عليا(دكتوراه)، قسم الهندسة الريفية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.
othman.ali@l.damascusuniversity.edu.sy

[2] أستاذ في قسم الهندسة الريفية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

[3] أستاذ في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

الملخص:

هدفت هذه الدراسة إلى عزل بكتيريا ***braakii*** Citrobacter الجذرية محفزة لنمو النبات (PGPR) من المحيط الجذري للنباتات النجيلية (القمح، الشعير)، حيث تم جمع ١٢ عينة من عدة مناطق مختلفة (دمشق– اللاذقية–طرطوس). تم عزل ٣٣ عزلة بكتيرية وإجراء الاختبارات المحددة للبكتيريا الجذرية المحفزة لنمو النبات، حيث تم اصطفاء ١٧ عزلة بكتيرية إيجابية. أظهرت النتائج تباين العزلات البكتيرية في قدرتها على الاستجابة للاختبارات الأساسية المحددة (تحليل البوتاسيوم–تحليل الفوسفات–تثبت الأزوت–انتاج حمض الإندول الخلي) وفي قدرتها على تحليل كربونات الكالسيوم– انتاج الامونيا، مما يدل على تنوع الأنواع البكتيرية في المحيط الجذري للقمح. وأعطت العزلة (٥.٢) أفضل النتائج في جميع الاختبارات.

بينت نتائج الاختبارات البيوكيمائية والجزيئية بتحليل DNA أن العزلة (٥.٢) التي أعطت أفضل مواصفات محفزة للنمو تنتمي الى النوع البكتيري citrobacter braakii .لذلك تم تسمية هذه العزلة **Citerobacter. braakii SY-oth5.2** وتتبع للبكتيريا المحفزة النمو.

الكلمات المفتاحية: البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات،PGPR، *Citrobacter braakii* .

تاريخ الايداع:٢٠٢٣/٤/٢٤
تاريخ القبول: ٢٠٢٣/٥/٢١

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

Isolation of Citrobacter *barrkii* , Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) from rhizosphere roots of cereals

Ali Mhmad Othman[*1] **Riyadh Bladia**[2] **Mahmoud Abo Ghorrah**[3]

[*1] Msc Student Dep. Rural engineering. Damascus University، Syria
othman.ali@l.damascusuniversity.edu.sy
[2] Professor، Dep. Rural engineering. Damascus University،Syria
[3] Professor، Dep. Plant protection. Damascus University،Syria

Received: 24/4/2023
Accepted: 21/5/2023

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

Abstract:

This study aims to isolate Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), from rhizosphere roots of cereals samples (wheat, barley), So we collected **12** samples from many different regions (Damascus- Latakia- Tartous). Specific tests for (plant growing promoting rhizobacteria) have been achieved for 33 isolates from samples and selected seventeen isolates which showed positive in one test at least. The results showeed the variance in the results of Plant Growing Promoting Rhizobacteria (PGPR), in the basic tests (solation of phosphate (p) , potassium(k), calcium carbonate (CaCo3) and fixing of nitrogen(N), and product the Indol Acetic Acid (IAA), and production of ammoniac (NH3). This proves there are diversity of bacteria species in the rhizosphere of wheat. And the isolation (5.2) gave the best results in all tests. The results of the biochemical and phylogenetic test by DNA sequences show that the isolated (5.2) belonged to the bacterial specie (**Citrobacter braakii**.), so it is named **C. braakii SY-oth5.2** under Plant Growing Promoting Rizobacterias.

Key Words: Citrobacter Braakii, Plant Growing Promoting Rhizobacter PGPR.

المقدمة والدراسات المرجعية:

يعتمد التوجه العالمي الحديث لتطوير طرائق تشجع نمو المحاصيل عبر تعزيز العناصر المغذية وأليات نمو المحاصيل، باستخدام الكائنات الحية الدقيقة المتخصصة، حيث تستخدم كملقحات مفردة أو مختلطة للبذور قبل الزراعة وتعتبر أسمدة حيوية ذات فعالية عالية (Quddus,2021).

تساعد بعض أنواع بكتيريا المحيط الجذري النبات على النمو من خلال تثبيت الأزوت الجوي بشكل حر بالإضافة الى تحليل العناصر المعدنية في التربة (الفوسفور والبوتاسيوم) مما يسهل امتصاصهما من قبل جذور النبات بالإضافة الى افرازها لهرمون النمو حمض الإندول الخلي (IAA) الذي يحفز نمو وانتشار المجموع الجذري (Agustiyan, 2021).

يمكن استعراض بعض الأبحاث التي أُجريت لدراسة أثر البكتريا الجذرية في محصول القمح، حيث تظهر التجارب أن استخدام البكتريا الجذرية (PGPR) في تلقيح بذور القمح يؤدي الى ارتفاع مؤشرات النمو (انتشار الجذور – المجموع الخضري – ارتفاع النبات–الوزن الجاف للنبات)، وترافق ذلك بارتفاع واضح في الغلة والإنتاج، مقارنة مع عدم التلقيح بالبكتيريا المذكورة (Khalid, 2004). وأكدت الأبحاث وجود زيادة في امتصاص النبات للعناصر الكبرى المغذية (N-P-K)الضرورية لنموه، مع ارتفاع غلة المحصول مقارنة مع الشاهد دون تلقيح.(Upadhyay and Singh, 2014) .

وكان للبكتريا المحللة للفوسفور (Phosphate solubilizing bacteria) أثر واضح في محصول القمح مع وجود تسميد بسوبر الفوسفات (P2O5)، مما أدى الى زيادة معنوية بانتشار الجذور وزيادة مساحة المجموع الخضري وارتفاع النبات كما ازدادت غلة الحبوب بحدود ٢٠ % مقارنة بعدم التلقيح (Afazal,2008).

عادة ما يتم استخدام أجناسCitrobacter.sp ، في تسريع تشكيل الكمبوست حيث يتوضح دور هذه الأجناس البكتيرية في تحليل المواد العضوية وإتاحة العناصر المغذية من خلال (تثبيت النيتروجين، إذابة الفوسفور والبوتاسيوم والسيليكات، إنتاج حمض الإندول والأمونيا والحديد)، بالإضافة الى تحفيز النشاط الانزيمي والتحكم البيولوجي بين العامل الميكروبي في الكومبوست (السماد الناتج) والنبات (Yukihiro Tashiro, 2017)

وفي دراسة أُجريت لفهم آلية نشاط البكتريا الجذرية(Citrobacter braakii) ، وكيفية تأثيرها على نمو النبات، من خلال نشاط انزيم الفايتيز (phytase) والذي يساعد على تحليل الفوسفات وتوفيره للنبات(Kim.w, 2003) واعتمادا على ذلك تم تحديد بشكل دقيق المورث المسؤول عن نشاط انزيم الفايتيز(Kim. Y, 2006) والذي يستخدم في التعديل الوراثي لأنواع البكتريا الجذرية اخرى لرفع افراز انزيم phytase، وهي تتبع للأجناس Pantoea وCitrobacter و Enterobacter و Pseudomonas و Rhizobium وEnsifer حيث تم التوصل الى أن السلالات البكتريا الجذرية المعدلة وراثياً تظهر مستويات مختلفة من نشاط إنزيم الفايتيز، تتراوح من ١٠ أضعاف إلى ٥٣٨ مرة أعلى من سلالات البكتيريا الشاهد (غير المعدلة) (Patel. 2010)

في مقارنة بين السلالات واختبار الخصائص الوظيفية لـ PGPR مثل تثبيت الأزوت وإذابة البوتاسيوم والفوسفات وإنتاج IAA، أظهرت النتائج تفوق عزلات البكتيريا التابعة لجنس Citrobacter، حيث أعطت قدرة عالية في تثبيت النيتروجين، والأعلى في تركيز IAA. المُنتج. وتم التوصية باستخدامها كسماد حيوي جديدة ومفيدة لتعزيز نمو النبات وتقليل استخدام الأسمدة الكيماوية (Denaya.2021).

ولما للبكتيريا الجذرية المحفزة للنمو أهمية في تنشيط نمو المحاصيل وزيادة الإنتاجية، هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتيريا من المحيط الجذري لنباتات (القمح والشعير) وتعريفها للاستفادة من خصائصها في تعزيز نمو النبات وزيادة الإنتاجية.

مواد البحث وطرائقه:

١- مادة الدراسة:

جُمعت اثنتا عشرة عينة من النباتات النجيلية (قمح–شعير) وتم العزل البكتيري من المحيط الجذري للنبات النجيلي للحصول على البكتريا المترافقة لنمو الجذور. كما يوضح الجدول مكان جمع كل عينة وتاريخ العزل مع الملاحظات المرفقة للعينة.

جدول (١) مصدر العينات المستخدمة في العزل البكتيري.

م	الرقم بالمخبر	مكان الجمع	النبات	تاريخ العزل	ملاحظات
1	1	دير الحجر–ريف دمشق	قمح بعل	04/03/2018	سنابل
2	2	كلية الزراعة–جامعة دمشق	قمح مروي	04/03/2018	
3	4	دير الحجر–ريف دمشق	قمح بعل	04/03/2018	
4	5	ريف جبلة – اللاذقية	قمح بعل	04/03/2018	موقع ١
5	6	ريف جبلة – اللاذقية	قمح بعل	04/03/2018	موقع ٢
6	12	دير الحجر –ريف دمشق	شعير بعل	14/03/2018	
7	17	الثانوية الزراعية – طرطوس	شعير	14/03/2018	
8	21	كلية الزراعة–جامعة دمشق	قمح بعل	01/04/2018	
9	22	مزة جبل – دمشق	نبات نجيلي بري	01/04/2018	سنابل فتية
10	23	منطقة يعفور –ريف دمشق	قمح مروي	01/04/2018	
11	24	دير علي–ريف دمشق	قمح مروي	01/04/2018	موقع ١
12	25	دير علي–ريف دمشق	قمح مروي	01/04/2018	موقع ٢

تم عزل مجموعة من العزلات البكتيرية في كل عينة، والتي تختلف من حيث الشكل والحجم واللون بحيث كان معظم المستعمرات البكتيرية ذات لون أبيض كريمي، وبعضها أعطى لون أصفر، بالإضافة الى الاختلاف بحجم النمو للمستعمرة البكتيرية، هذه الاختلافات كانت واضحة بتباين الأنواع البكتيرية مما أثر أيضا باستجابة كل منها للاختبارات المحدد للبكتيرية الجذرية المحفزة للنمو.

مكان التجربة والخطوات:

أجري العزل البكتيري في مخابر قسم وقاية النبات–كلية الزراعة–جامعة دمشق. حيث تزال عدة جذور من نبات القمح، وتغسل بالماء المقطر عدة مرات لإزالة التربة الملتصقة بها، ثم توضع في أنبوب اختبار يحتوي ١٠ ميلتر ماء مقطر معقم، وتُرج رجاً خفيفاً للحصول على معلق بكتيري.

يمدد المعلق البكتيري بحيث يؤخذ ١ مل من المعلق ويضع في ماء مقطر يكمل الى حجم ١٠مل وترج رجا خفيفا ليحصل التجانس البكتيري، تكرر عملية التمديد ثلاث مرات لنصل الى ثلاث تراكيز ($\frac{1}{10}$ – $\frac{1}{100}$ –$\frac{1}{1000}$)، ثم يؤخذ من كل تمديد للعينة

الواحدة ٥٠ ميكرولتر، وينشر على سطح طبق بتري يحتوي بيئة مغذية صلبة **(YPGA)**، ثم (١٥ غ أغار – ٧غ غلكوز –٧غ ببتون – ٧ غ مستخلص خميرة) لكل لتر مجهز للصب في أطباق تُحضن الأطباق على درجة ٢٨سْ لمدة أسبوع.

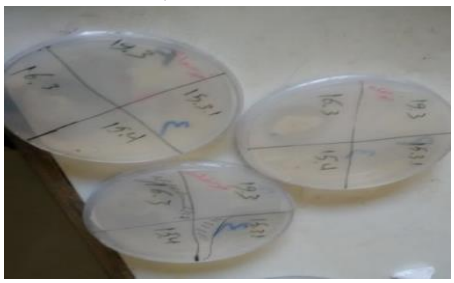
فُحصت الأطباق اعتباراً من اليوم الثالث، حيث يتم اختيار مستعمرات مختلفة الحجم واللون والشكل. يتم نقل كل مستعمرة منتخبة الى وسط مائل صلب **(PYDAC)**، (٣ غ ببتون – ٥ غ غلكوز – ٣ غ مستخلص خميرة – ١٥ غ آغار –٤٠ غ كربونات كالسيوم) لكل لتر مغطى بزيت البارافين المعقم وتحفظ في الثلاجة الى حين الاستخدام (Grigorova,1990).

أُعطت كل مستعمرة رقما يميزها بالمخبر حيث الرقم الأول يدل على الرقم التسلسلي للعينات للمحيط الجذري في المخبر، واختلاف التسلسل نتيجة وجود بحث في المخبر يقوم بالعزل البكتيري من المحيط الجذري للنبات أيضاً، والرقم الثاني يدل على المستعمرة البكتيرية من طبق العزل البكتيري لكل عينة بحيث من الممكن أن تحتوي العينات على عدة مستعمرات بكتيرية مختلفة بالحجم أو الشكل أو اللون ولتتميز فيما بينهما تم إعطاء رقم ثاني بعد الفاصلة.

٢-اختبارات محددة لصفات البكتريا الجذرية(PGPR):

١. اختبار قدرة البكتيريا على تحليل الفوسفات (P):

لمعرفة قدرة البكتيريا على تحليل الفوسفات، تم التلقيح البكتيري في اطباق بتري تحتوي على وسط مغذي (NBRIP) (١٠غ / ل غلكوز، ٢٥ غ/ل Ca3(Po4)، ٥غ/ل Mgcl2.6H2O، 0.25غ/ل MgSo4.7H2o، 0.1 غ/ل (NH4)2SO4، 15 غ/ل أغار) بوسط PH=7)



الشكل (١) تحليل الفوسفات.

حيث أُجري الزرع البكتيري باستخدام ابرة الزرع البكتيري بأخذ جزء من النمو البكتيري ووضعه في الطبق البتري، وتم التحضين على درجة حرارة ٣٢ ْس لمدة ٤٨ – ٩٦ ساعة (Deoraa.2007). إن وجود هالة شفافة محيطة بالمزرعة البكتيرية دليل تحليل الفوسفات، وتم تقدير كفاءة العزلات بتحليل الفوسفات من خلال قياس عرض الهالة (المسافة بين حدود البكتيريا والوسط غير الشفاف). وتم التمييز بإعطاء علامة (+) واحدة عند قياس حتى (٥) مم، وكل زيادة عن هذا الحد ب ٢ مم تم اعطاءه علامة أخرى لتصبح (++)، وعند تحلل مساحة أكبر من ذلك تأخذ ثلاث علامات (+++).

٢. اختبار قدرة البكتريا على تحليل البوتاسيوم(K):

تم زرع البكتيريا في أطباق تحتوي وسط آلكساندورف (15غ غلوكوز و ٠.٥غ كبريتات المغنيزيوم Mg SO4 و٠.١غ كربونات الكالسيوم CaCO3 و٠.٠٠٦ غ كلوريد الحديد FeCl3 و٢غ فوسفات الكالسيوم Ca3PO4 و٢٠ غ أغار +٢ غ فلدسبار البوتاس أو ميكا البوتاسيوم) (Manib.1986). بنفس الطريقة المتبعة في اختبار الفوسفات.

تتجلى إيجابية التحليل عن طريق ظهور هالة شفافة تدل على تحليل البوتاس من الوسط، وتم استخدام نفس الية العمل المتبعة في الاختبار السابقة بتحديد شدة تحليل البوتاس.

الشكل (٢) تحليل البوتاس.

الشكل (٣) تثبيت الأزوت الحر

٣. اختبار قدرة البكتريا على تثبيت الأزوت الحر:

لمعرفة قدرة البكتيريا على تثبيت الأزوت الجوي بشكل حر، تم زرع البكتريا في اطباق بتري وسط مغذي يحتوي على (٥ غ سكروز – ٠.٢ غ K2HPO4 – ٠.٦ غ KH2PO4 – ٠.٢ غ MgSO4.7H2O – ٠.٠٢غ Cacl2.2H2O – ٢ مل Bromthymol محلول أزرق (0.2N KoH) – ٤ مل محلول الحديدي (1.64%) Fe (III) EDTA – ٢ مل محلول فيتامين D– ١٥ غ أغار). حيث تم تقسيم الطبق الى أربعة أجزاء بكل جزء تم وضع عزلة بكتيرية وكان الوسط مغذي ازرق اللون، حيث أن ظهور اللون البرتقالي في الوسط المغذي الأزرق هو دليل على قدرة البكتريا على تثبيت الأزوت الجوي وفقا ما هو موضح في الشكل (٣).

٤. اختبار قدرة البكتريا على انتاج حمض الإندول الخلي.

أُخذ جزء من بكتيريا فتية بعمر ٢٤–٤٨ ساعة لتلقيح ١٠٠ مل من سائل مغذي معقم NBRIP، يحتوي على ١ مل تريبتوفان بتركيز ٠.٢ %، ثم حضنت لمدة ٢٤ ساعة مع اهتزاز خفيف(١٠٠ هزة بالدقيقة) ،على درجة حرارة ٣٠ °م، مع وضع عينة غير ملقحة كشاهد، وتؤخذ كمية ٥ مل من كل دورق ، وتثفل بالطارد المركزي لمدة ١٠ دقائق بسرعة دوران ١٢٠٠٠ rpm ، يُؤخذ **١ مل** من السائل الطافي من المعلق ويضاف له ٤ مل من كاشف سالكولسكي (٥٠ مل حمض بيركلوريك HCIO4 بتركيز ٣٥٪، ١مل من محلول كلوريد الحديد Fecl3) ، يوضع الخليط في مكان معتم على درجة حرارة ٣٧ ° س لمدة ٣٠ دقيقة. تحول اللون الى الوردي دليل وجود انتاج لحمض الإندول الخلي، (Gutierrez. 2009).

تم اعتماد التدرج اللوني بين الأصفر والوردي لقياس شدة انتاج حمض الإندول الخلي، في حال كان أصفر أعطي علامة واحدة (+)، وعند اللون الوردي أعطي (+++) ثلاث علامات.

٥. اختبار قدرة البكتريا على تحليل كربونات الكالسيوم CaCO3:

تم استخدام وسط مغذي يحتوي كربونات الكالسيوم في أطباق بتري (١غ مستخلص خميرة– ١٠ غ مانيتول – ٠.٥ غ K2HPO4 –٠.٢ غ سلفات المغنيزيوم – ٠.١ كلوريد الصوديوم – ٢ غ كربونات الكالسيوم –١٥ غ أغار) وتم زرع البكتيريا في الأطباق بأخذ جزء من مزرعة بكتيرية ووضعها على الوسط المغذي، حيث تم وضع أربع عزلات في كل طبق. والتحضين لمدة أسبوع إلى أسبوعين. حيث أن ظهور هالة شفاف في الوسط الأبيض الكريم يدل على قدرة هذه البكتيريا على تحليل كربونات الكالسيوم، وتم اعتماد نفس الية قياس شدة تحليل كل من الفوسفات والبوتاس في هذا الاختبار أيضا حيث أن السلم المتبع في الاختبارات تم اعتماده لتقيم كفاءة العزلة واختلاف استجابة كل منها (أبو غرة–اتصال شخصي).

٦. اختبار قدرة البكتريا على انتاج الأمونيا :

تم الزرع البكتيري في ٥ مل من الوسط السائل المغذي الذي يحتوي على (10غ بيبتون – ٥ غ كلوريد الصوديو) ، وبعد التحضين لمدة ٢٤ ساعة، نقوم بإضافة المشعر

(Nessler reagent 0.5 ml) بمعدل ٢:١ ، ظهور اللون الأصفر دليل قدرة البكتيريا على انتاج الامونيا ، تم تحديد أعلى كفاءة لإنتاج الأمونيا هو ظهور اللون الأصفر بشكل واضح واللون البرتقالي أقل كفاءة (Cappuccino and Sherman, 1992)

٣- الاختبارات البيوكيمائية التعريفية:

اختبار غرام (Gram test) بظهور البكتيريا الموجبة بلون بنفسجي داكن، البكتيريا سالبة غرام تظهر بلون وردي أو أحمر وفقا لطريقة (Grigorova,1990). **واختبار التنفس تخمير السكري (الغلكوز) :** تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر يدل على إيجابية العزلة الموجب وفق الطريقة المتبعة من قبل (Harrigan,1998).

اختبار الأوكسيداز: تستخدم أقراص من شركة Bio Merieux حيث تنقل المستعمرة بحلقة التلقيح إلى القرص، ظهور اللون البنفسجي الاختبار موجب (Harrigan.1998).

تم اختبار قدرة البكتريا على التبوغ (تشكيل الأبواغ). (Harrigan,1998).

٤- استخلاص الـ DNA وتفاعل الـ PCR وتحديد التتابع النكليوتيدي

تم عزل الـ DNA البكتيري من مستعمرات بكتيرية بعمر ٢٤ ساعة باستخدام DNA wizard isolation and purification kit من شركة Promega وفق تعليمات الشركة الصانعة Wizard ® Genomic DNA Purification Kit- Technical Manual، ثم حددت تركيز ونقاوة الـ DNAالبكتيريا باستخدام جهاز المطياف الضوئي على أطوال أمواج A260/A230 نانومتر.

حُضرت تمديدات الـ DNA بتركيز نهائي ١٠ نانوغرام/ميكرولتر لاستخدامها في اختبارات الـ PCR المعتمدة على الـ DNA في مركز البحوث الإيطالية في مدينة ميلانو –ايطاليا.

.Macrogen-Europe (Milan Genome Center DNA sequencing laboratory)

أُجري تفاعل الـ PCR بحجم نهائي ٥٠ ميكرولتر، يحتوي ٥ ميكرولتر من الـ DNA و٢ميكرو لتر لكل بادئ من زوج بادئات المستخدم بتركيز µl poml/ 10، حيث البادئ المباشر For f) (8-27 بتسلسل نكليوتيدي -′5 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-′3 والبادئ غير المباشر Rev (١٤٩٢r-١٥١٠) -′5 GGCTACCTTGTTACGACTT -′3 وهي بادئات عامة يضخم جزء من مورثات Sr RNA ١٦(Lane .1991).

وأُستخدم ٢٥ ميكرو لترمن (Biocompare GoTap G2–Hot Start Green Master Mix) وفق تعليمات الشركة (Promega)، وأكمل الحجم بإضافة ٢١ ميكرولتر من الماء المقطر المعقم.

أُجري تفاعل الـPCR باستخدام جهاز المدور الحراري المصنع من قبل شركة (BIORAD)، وفق البرنامج التالي: خمسة دقائق على درجة حرارة ٩٥ْس لفصل سلسلتي الـ DNA، وتلته ٣٥ دورة (٩٥ْس لمدة دقيقة)، ومن ثم مرحلة ارتباط البادئات على درجة حرارة ٦٥ْس لمدة ٤٥ ثانية، بعدها استطالة الـ DNA على درجة حرارة ٧٢ْس لمدة دقيقة ونصف، وعلى درجة حرارة ٧٢ْس لمدة خمسة عشر دقيقة كمرحلة أخيرة لاستكمال الاستطالة.

رُحلت نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة Agarose(تركيزها ١٪)، وباستخدام محلول منظم للرحلان (TBE 1X)، واستخدام (Agrobacterium.vitis) كشاهد موجب والماء المقطر المعقم كشاهد سالب، بالمقارنة مع 1Kb Plus DNA Ladder المؤشر الجزيئي وفق الارشادات المتبعة للوصول الى حزمة الوزن الجزيئي.

تم تنقية نواتج تفاعل PCR باستخدام (QIAquick ,Hilden,Germany)، تبعاً لإرشادات الشركة المصنعة لتحديد الـ DNA في كلا الاتجاهين باستخدام زوج من البادئات العامة **f 27-8** و**r 1492-1510** (Macrogen Korea)، وتحديد التتابع النكليوتيدي بصيغة ملف (ab1)، وعليه تم تحديد نوع البكتيريا باستخدام قاعدة بيانات BLAST على موقع NCBI البنك الوراثي.

النتائج ومناقشتها:

نتائج الاختبارات المحددة للبكتيرية الجذرية المحفزة للنمو (PGPR):

توضح النتائج تباين واضح في استجابة العزلات البكتيرية، مما يؤكد التنوع الميكروبي للمحيط الجذري للنباتات النجيلية، تم اخذ ٣٣ عزلة بكتيرية مختلفة من العينات التي تم جمعها، وتم استبعاد العزلات التي كانت نتائجها سلبية في جميع الاختبارات وهي (١.١-٢.١-٢.٢-٢.٣-٢.٤-٢.٥-٤.١-٤.٢-٥.١-٦.١-٦.٢-٦.٣-١٢.١-٢٤.١-٢٤.٢-٢٤.٣) واصطفاء العزلات التي تمتلك على الأقل خاصية واحدة من خصائص البكتيرية الجذرية المحفزة للنمو كما هو موضح بالجدول (٢) . تبين النتائج وجود تباين بالعزلات البكتيرية في كل من الاختبارات المحددة للبكتيرية الجذرية المحفزة للنمو، وتختلف كل عزلة باستجابتها لهذه الاختبارات منها من يمتلك صفة واحدة من الخصائص المدروسة، بينما امتلاك البعض عدة صفات مجتمعة حيث تم اعتماد كفاءة الاختبار وعدد الصفات التي تتمتع بها العينة لاختيار انسب عزلة بكتيرية.

حيث أظهرت ست عزلات فقط القدرة على تحليل الفوسفات مخبرياً، بفعالية متباينة، وكانت العزلة ٢٤.٤ متفوقة على جميع العزلات بالقدرة على تحليل الفوسفات (++++) في السلم الذي تم وضعه عند القيام بتجربة تحليل الفوسفات.

وبالنسبة الى اختبار تحليل البوتاسيوم أيضا لم تملك جميع العزلات القدرة على تحليل البوتاسيوم، حيث تمكنت سبعة عزلات فقط وأربعة منها كان لديها أيضا القدرة على تحليل الفوسفات ايضاً. حيث كانت العزلة ٢٣.١.١ أكثر كفاءة في تحليل البوتاس بالإضافة الى تحليلها للفوسفات، ولكن كانت ذات نتائج سلبية ببقية الاختبارات.

وأظهرت النتائج أن قدرة البكتيرية على تثبيت الأزوت الجوي لم تكن موجودة إلا في أربع عزلات فقط، واختلاف في استجابة العزلات حيث ثلاث منها لم تكن ذات نتائج إيجابية في بقية الاختبارات، وهذا يدل على اختلاف العزلات فيما بينها ولكل منها الية معينة، بينما تمتعت العزلة ٥.٢ بالقدرة على تحليل البوتاس والفوسفات إضافة الى تثبيت الأزوت، كما تبين النتائج أيضا قدرتها على انتاج حمض الإندول الخلي بنسب جيدة (+++) مقارنة مع سبع عزلات تمكنت من ذلك ويبين الجدول تفوق العزلة ٤.٣ بإنتاج الحمض الإندول الخلي.

جدول (٢) نتائج الاختبارات المحددة للبكتيرية الجذرية المحفزة للنمو.

الرقم بالمخبر	العزلة	P	K	N	IAA	caco3	NH3
2	2.6	-	+	-	++	-	-
4	4.3	-	+	-	+++	-	++
4	4.4	-	-	-	-	-	++
5	5.2	++	+++	++	+++	+++	+++
6	6.4	-	-	-	-	++	+++
6	6.5	-	+	-	-	+	-
17	17.1	-	-	++	-	-	-
17	17.2	-	-	-	-	-	+
21	21.1	-	-	-	+	-	+
22	22.1.2	+	-	-	-	-	+
22	22.1.1	+++	+	-	++	-	++
23	23.1	+	-	+++	-	+	+++
23	23.1.1	++	+++	-	-	-	-
23	23.2	-	-	-	-	-	++
24	24.4	+++	++	-	-	+	+++
25	25.1	-	-	-	++	-	-
25	25.2	-	-	+++	+	+	-

(– سلبية الاختبار، + إيجابية الاختبار، ++ إيجابية بكفاءة جيدة، +++ إيجابية بكفاءة ممتازة)

توضح نتائج العزلات بوجود ست عزلات مختلفة تقوم بتحليل كربونات الكالسيوم ومنها من أعطت نتائج إيجابية باختبار او أكثر من الاختبارات، أما اختبار الامونيا فكانت العزلات أكثر استجابة لهذا الاختبار، باختلافات واضحة بفعالة كل منها حيث تباين نشاط أحد عشر عزلة من العزلات في قدرتها على تحليل الامونيا حيث كانت أكثر كفاءة (٥.٢–٦.٤ – ٢٣.١–٢٤.٤) من بين العزلات المدروسة.

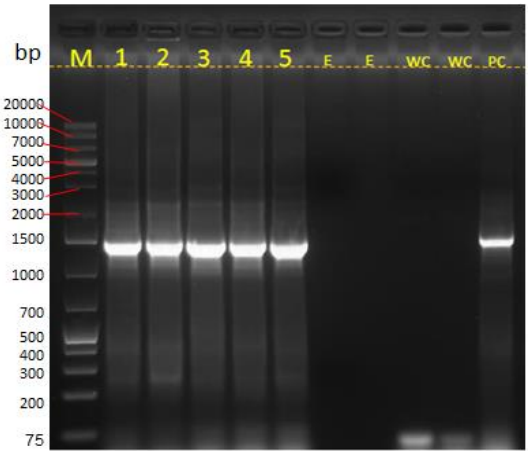
بناءً على هذه النتائج يتبين لدينا بأن العزلة ٥.٢، هي أفضل العزلات البكتيرية المأخوذة من المحيط الجذري للقمح، حيث أعطت نتائج ممتازة في جميع الاختبارات المحددة للبكتيرية الجذرية المحفزة للنمو وعليه قمنا بإجراء تحليل وراثي لتعريفها بشكل دقيق.

وبالرجوع الى مكان عزلة هذه العينة وفق الجدول (١)، تبين لدينا بأنها من المحيط الجذري لنبات القمح بمنطقة بعلية في محافظة اللاذقية–منطقة ريف جبلة.

التعريف الجزيئي للعزلة (٥.٢):

أظهرت نتائج الاختبارات البيوكيمائية التعريفية للعزلة (٥.٢) بأنها سالبة غرام، عصوية الشكل، ليس لديها القدرة على التبوغ، اختيارية التنفس، وأعطت نتائج إيجابية في اختبار H2s، وسالبة في اختبار الأوكسيداز، وهذه الاختبارات لم تكفي لتعريفها على مستوى النوع لذلك تم تعريفها على المستوى الجزيئي بتحديد تتابع النكليوتيدات في مورثة .16 Sr DNA

حيث بينت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة (Agarrose ١ %) وجود الحزمة المرغوبة بوزن جزيئي 1400 bp تقريبا وفق مقياس 1kb plus DNA Ladder، وأن الـ DNA لبكتيري المدروسة سليمة وتقع أسفل الشاهد الموجب بقليل.



M: 1kb plus DNA Ladder
4: SY-5.2
WC: شاهد سالب (الماء)
PC: (A.VITIS) شاهد موجب
E: empty
1 –2-3 –5 : غير معرفة

الشكل (٤) صورة للرحلان الكهربائي (PCR) للعزلة(٥.٢ _SY)

يُظهر الشكل (٥) تحديد التتابع النكليوتيدي للمورثة 16Sr DNA عند العزل ٥.٢ ذو حجم 1291أساس أزوتي:

>220328-001_O17_ SY-5.2
TCCACAGAGGAGCTTGGCTCCTTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGT
AATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAG
CTAATACCGCATAACGTCCCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT
TGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCT
CACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGTTGGGGTTAATA
ACCGTGTCCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGC
TCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGG
GGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA
CCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAGA
GCGTGGGGAGCACACAGGATTATATACTCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGTCAACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTTAAGTCTACCGCCTGGAGAGTACCGCCGCAGGGTTAAGACTCATATGA
ATTGACGGGGGGCGCGCACACGCGGTGGAGCGTGTGGTTTATTTCTATGCA
ACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACGTCCAGAGAATTAGATAAAGATG
CATTAGTGCCTTCGGGAACTCTGAAACAGGTGCTGCATGCCTGTCGTCAC
CTCCTCCTCCCGAATGGTGGATTTATGTCCTCCACCACCCGCACCCCTCA
CCCTTGTTTGGTTGGGGTTAAGGCGGGGAGCTCAGGGGAAAAATACCCCG
CCCCCCCCGCCACAAAAGGGGGGAGGGGGGGGGGTAATTTTTCCCTTTGG
GGGGGTGGCTCAACCAAAGGGAAACAGGGGGGGGCAAGGGGGAAGAAAAA
ACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCACCCCGCCCCTTTAAAAAGGGGGGG
GGGGGGGGCCCCCCCCCCCTCCCCTCCCCCCCGAAAAAGTT

الشكل (٥) التتابع النكليوتيدي للعزلة (٥.٢)

باستخدام قاعدة البيانات Blast على موقع NCBI، أظهر التحليل أن العزلة البكتيرية تنتمي الى عائلة Enterobacteria جنس citerobacter وتتبع الى النوع c.braakii وأقرب وراثياً الى Citrobacter braakii OS-2، ونسبة تشابه ٩٦.٥١ بالمئة.

تم استخراج تتالي النكليوتيدات لعدد من العزلات من البنك NCBI وهي:

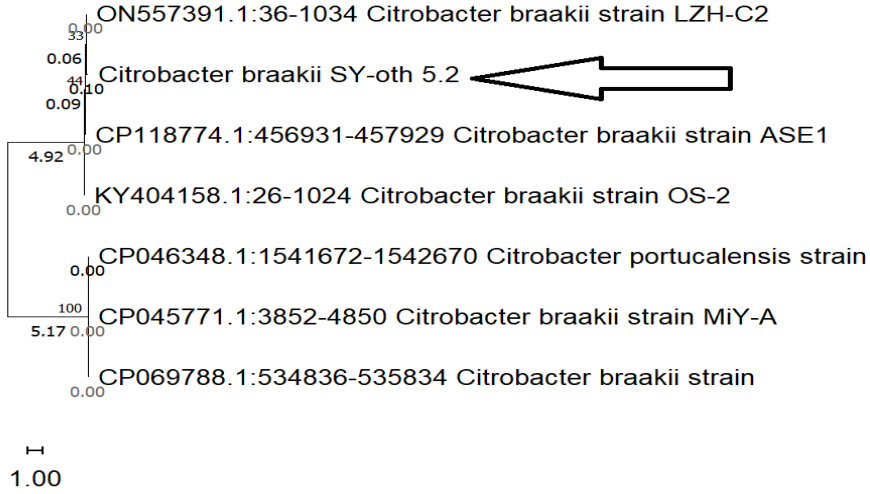
١. KY404158.1:26-1024 Citrobacter braakii strain OS-2
٢. CP118774.1:456931-457929 Citrobacter braakii strain ASE1

٣. ON557391.1:36-1034 Citrobacter braakii strain LZH-C2
٤. CP045771.1:3852-4850 Citrobacter braakii strain MiY-A
٥. CP069788.1:534836-535834 Citrobacter braakii strain
٦. CP046348.1:1541672-1542670 Citrobacter portucalensis

التي استخدمت في رسم شجرة القرابة الوراثية للعزلة المدروسة جزيئيا (٥.٢)، باستخدام الطريقة (Neighbor-Joining method). وتم حساب مسافات التقارب الوراثي باستخدام طريقة الإحصائية (Maximum Composite Likelihood)بين االعزلات البكتيرية الداخلة بالتحليل باستخدام برنامج MEGA11 (Tamura, 2021).

وبحسابات إحصائية للعزلات الداخلة في التحليل الوراثي، نلاحظ من مصفوفة التشابه الناتجة بموقع (Secuences Identites And Similarities)، للملف الناتج بصيغة (Fast) من البرنامج المستخدم، يتوضح لدينا بأن أقرب سلالة ٩٦.٠٦ % مع العزلة المدروسة وهي سلالة OS-2، في حين تتطابق السلالتين (LZH-C2 و ASE1) بنسبة ٩٩.٩٪ مع بعضهما بنسبة تشابه مع العزلة تصل الى ٩٥.٩٪.

في حين تبتعد السلالات الثلاثة المتبقية وراثيا كما هو موضح بالشجرة الوراثية، واتخاذها فرع اخر بحيث لم تتجاوز نسبة التشابه مع العزلة المدروسة الى ٣٧ %، مع تطابقها فيما بينها بنسبة مئوية وصلت الى ٩٩.٩ %.



الشكل (٦) شجرة القرابة الوراثية للعزلة البكتيرية(٥.٢).

حيث تُظهر شجرة القرابة الوراثية الشكل (٦) أن **C. braakii SY-oth 5.2** في شجرة القرابة الوراثية التي انقسمت الى فرعين رئيسين، تقع العزلة (٥.٢) مع ثلاث سلالات بكتيرية من النوع C.braakii وهم (OS-2، ASE1، LZH-C2)، مما يؤكد التقارب الوراثي مع هذه السلالات بكتيرية مع تطابق كبير مع السلالة LZH-C2.

ويضم الفرع الثاني من الشجرة الوراثية سلالتين من النوع C.braakii وهما (MiY-A، Strain) وتقاربهم وراثيا مع نوع C.portucalensis ، وتباعدهما وراثيا مع الفرع الذي يحوي العزلة المدروسة.

المناقشة:

تؤكد النتائج قدرة هذه العزلة على تحليل الفوسفات الذي يعد أحد أفضل الخصائص للنوع البكتيري المدروس citrobacter braakii ، وهو ما تم توضيحه بالدراسات السابقة، وكيفية استخدام هذه البكتيرية للتعديل الوراثي من اجل زيادة انتاج انزيم (phytase) المسؤول عن قدرة البكتيريا على تحليل الفوسفات وفق ما حدده (Kim. 2006)، بوجود جزء من التسلسل النكليوتيدي مسؤول عن انتاج انزيم (phytase) ، الذي استخدم لتحسين وتعديل باقي أنواع البكتيرية الجذرية المحفزة للنمو في مجال تحليل الفوسفات من قبل. (Patel.2010)

كما تؤكد النتائج بأن السلالة المدروسة لها القدرة على تثبيت الازوت الجوي وتحليل البوتاس، وهذا ما أكدته الدراسات المقامة من قبل Denaya وزملاؤه عام ٢٠٢١ على عدة سلالات تابعة لجنس citrobacter حيث كانت كل السلالات ذات قدرة واضحة على تحليل البوتاس والفوسفات وتثبيت الازوت الجوي.

بالإضافة إلى تفوق سلالات citrobacter braakii على أجناس البكتيرية الجذرية المحفزة للنمو من حيث انتاج حمض الإندول الخلي، وهو ما يتشابه مع نتائج الاختبارات بالسلالة المدروسة.

بالإضافة لما ذكر من خصائص مهمة للجنس citrobacter في تحفيز نمو النبات، تم دراسة عدة خصائص أيضا لتحديد مدى فعالية السلالة المدروسة، حيث يؤكد الجدول قدرة السلالة المدروسة على تحليل أيضا كربونات الكالسيوم وإتاحة الامونيا ولا يوجد مرجعية واضحة تدعم قدرة سلالات الجنس المدروس على هاتين الخاصيتين، حيث لم يتم التطرق بالاختبارات المقامة سابقا على هذه الميزتين، حيث تم اختيار كربونات الكالسيوم لما له انتشار كبير في الترب السورية.

الاستنتاجات:

١. أظهرت الدراسة وجود طيف واسع من البكتيريا الجذرية المحفزة للنمو في المحيط الجذري لنبات القمح.
٢. كما أكدت تباين نتائج البكتيريا الجذرية المحفزة للنمو في الاختبارات الأساسية المحددة لها (تحليل البوتاسيوم–تحليل الفوسفات–تثبت الأزوت–انتاج حمض الإندول الخلي)
٣. تُظهر الدراسة استجابة بعض أنواع البكتيريا الجذرية المحفزة للنمو وقدرتها على تحليل كربونات الكالسيوم–تحليل الامونيا.
٤. أظهرت شجرة القرابة الوراثية أن أفضل العزلة المدروسة وفق المجتمع المدروس يتبع الى النوع citrobacter braakii والتي تعد من أفضل أنواع البكتيرية الجذرية المحفزة النمو من حيث تحليل الفوسفات وإنتاج حمض الإندول الخلي.
٥. اقتراح تسمية العزلة البكتيرية Citrobacter braakii SY-oth5.2 كسلالة بكتيرية، من النوع البكتيري المذكور التابع للبكتيرية الجذرية المحفزة النمو، وتسجيلها في البنك الوراثي.

التوصيات:

١. استخدام السلالة Citrobacter braakii SY-oth5.2 كبكتيريا جذرية محفزة للنمو، في الدراسات المخبرية والحقلية للوصول الى الغاية المرجوة منها كمخصب حيوي.

٢. العمل على إيجاد مجموعة من السلالات من البكتيرية الجذرية المحفزة للنمو المميزة في المخابر المحلية محددة ومعرفة وراثيا بشكل دقيق لاستخدامها في التجارب الزراعية، بما يتناسب مع توصيات كل نوع بكتيري منها.

٣. استخدام البكتيرية الجذرية المحفزة للنمو كأسمدة حيوية نظيفة تعزيز نمو النبات، وفق التوجه العالمي لهذه الزراعات وفق دراسات علمية ليتم تعميمها على نطاق أوسع لرفد القطاع الزراعي عبر زيادة الانتاج وبالأخص المحاصيل الاستراتيجية التي تزرع على مساحات واسعة.

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

Reference:

1. Afazal.A,Bano.A (2008) **Rhizobium and Phosphate Solubilizing Bacteria Improve the Yield and Phosphorus Uptake in Wheat (Triticum aestivum)** International Journal of Agriculture and Biology
2. Agustiyani, D., Dewi, T. K., Laili, N., Nditasari, A., & Antonius, S. (2021). **Exploring biofertilizer potential of plant growth-promoting rhizobacteria candidates from different plant ecosystems. Biodiversitas**
3. Cappuccino, J. C., Sherman, N., (1992). In: **Microbiology: A Laboratory Manua**l, New York, pp. 125–179.
4. Deoraa A, Hashidokoa Y, Rahmana A, Itoa T, Taharaa S (2007) **Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizoplane of Oryza sativa L**. cv. BR29 of Bangladesh. Z Naturforsch
5. GRIGOROVA, R. (1990). **Techniques in Microbial Ecology (Methods in Microbiology)**,
6. Gutierrez CK, Matsui GY, Lincoln DE, Lovell CR (2009). **Production of the phytohormone indole-3-acetic acid by the estuarine species of the genus** *Vibrio*. Appl. Environ. Microbiol. 75:2253-2258
7. Harrigan, W.F. (1998). **Laboratory methods in Microbiology Academics** Press,
8. Khalid. A , Arshad. M and Zahir. Z.A. 2004 (**Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat**)
9. Lane.DJ(1991)**16S/23SrRNAsequencing**.In:StackebrandtE,GoodfellowM(eds)Nucleicacidtechniquesinbacterialsystematics.Wiley,NewYork,pp115–175
10. Manib.M, Zahra.M.K, S.H.I.(1986) **Abdel-Al and A. Heggo, Role of silicate bacteria in releasing K and silicone from biotite and orthoclase. In: Soil biology and consevation of the biosphere**
11. Quddus.F ,(2021) **Recent Advances in Biofertilizer** (PDF) Recent Advances in Biofertilizer (researchgate.net)
12. Saitou N. and Nei M. (1987). **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees**.
13. Secuences Identites And Similarities Immunomedicine Group: Tools >> SIAS (ucm.es)
14. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11**.
15. Upadhyay.S.K and Singh.D.P ,(2014)**Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment**)
16. Wizard® Genomic DNA Purification- Kit Technical manual - (**Isolating Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria**) P14 Promega Corporation **www.promega.com**