Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 41 No.3 (2025): 64 - 79

مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 41 العدد 3(2025): 64- 79

تحري إمكانية بكتيريا محلية معزولة من المحيط الجذري للقمح في إنتاج حمض الأندول الخلي والأمونيا وتحليل الفوسفات

وسيم البلخي*[1]   محمود حسن أبوغرة [2]   محمد فواز العظمة[3]

[1]* طالب دراسات عليا، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق
[2] أستاذ في قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة جامعة دمشق
[3] أستاذ في قسم وقاية النبات ،كلية الزراعة – جامعة دمشق

تاريخ الايداع: 29/ 4/ 2023
تاريخ القبول: 11/ 7/ 2023

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

الملخص :

هدفت هذه الدراسة الى عزل بكتيريا محلية من منطقة المحيط الجذري لبعض النباتات النجيلية المزروعة والبرية في عدة مناطق من سورية وتحديد بعض صفات هذه العزلات ومدى انتمائها لمجموعة البكتيريا المعززة لنمو النبات PGPR من خلال تميزها بتيسير الفوسفات أو انتاج الامونيا أو انتاج حمض الاندول الخلي IAA حيث تم عزل 22 عزلة محلية من 10 مناطق مختلفة ومقارنتها بثلاثة عزلات موجودة في مختبر الامراض البكتيرية .

بينت نتائج اختبار /22/ عزلة ان 27.2% منها فقط كانت محللة للفوسفور بينما 22.7% من العزلات أنتجت حمض الاندول الخلي IAA وتميزت 40.9% من العزلات بإنتاج الامونيا ، وكانت أفضل عزلة هي 10.2 وبنتيجة التحليل البيوكيميائي والجزيئي وشجرة القرابة تبين انها تنتمي الى النوع البكتيري Serratia liquefaciens.

الكلمات المفتاحية : المحيط الجذري، Serratia liquefaciens ، البكتيريا المعززة لنمو النبات (PGPR)

Investigate the possibility of local bacteria isolated from the rhizosphere of wheat in producing indole acetic acid, ammonia and phosphate Solubilization

Waseem Al-Balkhi *[1] Mahmoud hasanAbu-Ghorrah [2] Fawaz Al-Adma[3]

[1]Postgraduate student, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University

[2]Professor at the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University

[3] Professor at the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture - Damascus University

Received: 29/4 /2023
Accepted: 11 /7 /2023

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

Abstract:

This study aimed to isolate local bacteria from the rhizosphere of some cultivated and wild grasses in several regions of Syria and to determine some characteristics of these isolates and their affiliation to the group of plant growth-promoting bacteria PGPR by characterizing them by facilitating phosphate or producing ammonia or indole acetic acid IAA. 22 local isolates were isolated from 10 different regions and compared with three isolates existing in the bacterial diseases laboratory. The results of testing 22 isolates showed that only 27.2% of them were phosphate solubilizers, while only 22.7% of the isolates produced indole acetic acid IAA and 40.9% of the isolates were characterized by producing ammonia, and the best isolate was 10.2 and as a result of biochemical and molecular analysis and the kinship tree, it was found that it belongs to the bacterial species Serratia liquefaciens.

Keywords: Rhizosphere, Serratia Liquefaciens ،Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPR)

المقدمة والدراسة المرجعية :

يعتبر القمح من أهم المحاصيل الزراعية على مستوى العالم، فهو يحتوي على العديد من العناصر الغذائية المفيدة مثل الألياف والفيتامينات والمعادن والبروتينات. كما أن لـه فوائد صحية عديدة، مثل تحسين عملية الهضم والأيض، وتقليل خطر الإصابة بالسكري والسرطان، و تعزيز صحة القلب والأوعية الدموية، وحماية الجسم من بعض الأمراض المزمنة (Shewry & Hey, 2015). ولذلك تعتمد عليه الدول في تحقيق الأمن الغذائي والتغذية الصحية، ففي عام 2020 وصلت كمية القمح التي تمت زراعتها إلى 760 مليون طن، وهذا ما يجعل القمح ثاني أكثر الحبوب زراعة بعد الذرة. وتعد كل من روسيا والولايات المتحدة وكندا وفرنسا وأوكرانيا أكبر مصدري القمح عالمياً. إلى جانب استخدامه كغذاء أساسي للبشر، فهو يستخدم في بعض المناطق كغذاء للحيوانات (Igrejas & Branlard, 2020) ومن المتوقع أن يصل عدد سكان العالم إلى 9.8 مليار بحلول عام 2050. ولذلك هناك حاجة ملحة لزيادة إنتاج الغذاء لتلبية احتياجات السكان المتزايدين .ومع ذلك ، من المحتمل أن تشكل محدودية موارد الأراضي والمياه ، وتغير المناخ ، وزيادة تكرار الظواهر المناخية المتطرفة إضافة الى الإجهادات الحيوية واللاحيوية تهديدًا كبيرًا لتحقيق هدف الزراعة المستدامة. (Karthikeyan et al., 2020). وقد أدى هذا الطلب المتزايد على الغذاء في ظل هذه التهديدات إلى تطوير واعتماد الأسمدة الكيميائية والمبيدات الاصطناعية كاستراتيجية سريعة وفعالة لإدارة آفات وأمراض المحاصيل عموما بما في ذلك القمح، ولكن الاعتماد المفرط على المبيدات والأسمدة الكيميائية تسبب بآثارها ضارة على صحة الإنسان، والبيئة، وتطوير سلالات مقاومة للآفات ومسببات الأمراض، لذلك ، يتم اعتماد التوجه الى الإنتاج الزراعي المستدام والآمن (Lengai et al., 2020) والذي يعتمد على الأحياء الدقيقة كاستراتيجية فعالة ومستدامة و في هذا الصدد ، أثبتت البكتيريا المعززة لنمو النبات (PGPRS) بشكل عام، أنها فعالة للغاية اذ يمكن أن تحسن نمو النبات والغلة وكذلك الحفاظ على خصوبة التربة، ويتم تحقيق ذلك من خلال استغلال التفاعلات بين النباتات والكائنات الدقيقة في منطقة الجذور (Pathania et al., 2020) بالإضافة الى تحسن تحمل الإجهاد الحيوي وغير الحيوي، ومساعدة النباتات على اكتساب المغذيات وتحسين صحة النبات و تلعب PGPRs دورًا مهمًا في تعزيز خصوبة التربة وتحويل العناصر الغذائية غير المتوفرة أو المتاحة إلى الشكل المتاح الميسر وجعلها مفيدة للنباتات ، وتحفيز نمو النبات وقمع مسببات الأمراض النباتية. تشمل PGPR على العديد من الأجناس على سبيل المثال: ,Clostridium, Azospirillum, Enterobacter , Azoarcus ,Klebsiella Aeromonas , Pseudomonas (Pathania et al., .Serratia, Bacillus , Gluconacetobacter Rhizobium, , Arthobacter , Azotobacter (2020 ويمكن تلخيص الأثار المفيدة لـ PGPR ، على نباتها المضيف ، بتنشيط النمو وتنظيم التمثيل الغذائي وتعديل إشارات الهرمونات النباتية التي تساهم في التكيف مع الظروف البيئية (AlAli et al., 2022) إضافة الى تيسير واذابة الفوسفات و الذي يعتبر عنصرًا أساسيًا لنمو النبات ولكنه نادرًا ما يتوفر في التربة. حيث يوجد الفوسفور بشكل طبيعي بصورة عضوية ولا عضوية و كلاهما غير قابل للذوبان بشكل كبير (بشكل عام القابل للذوبان لا يزيد عن 5 ٪) وبالتالي لا يمكن امتصاصه بواسطة الجذور وهنا يأتي دور بكتيريا PGPR بافراز انزيم الفوسفاتاز لتحلل الأشكال العضوية للفوسفات وجعله قابلاً للامتصاص من قبل النبات كما تقوم بإنتاج الأحماض العضوية، مثل حمض الستريك والجلوكونيك واللاكتيك والماليك والأوكساليك ، التي تخفض من درجة الحموضة في التربة و الكاتيونات المعدنية (مثل Ca^{2+} وFe^{3+} وAl^{3+}) التي تربط الفوسفات، مما يجعله أكثر قابلية للذوبان ومتاحًا للنباتات . وايضاً تقوم باذابة البوتاس والذي يتواجد اكثر من 98% منه بصورة غير متاحة للنبات حيث تقوم بكتيريا (KSB (Potassium solubilizing bacteria بتحويل البوتاسيوم من الأشكال غير القابلة للذوبان مثل الميكا والفلدسبار إلى أشكال قابلة للذوبان يمكن امتصاصها بسهولة من قبل النباتات(Berde et al., 2021). تستخدم KSB آليات مختلفة لذوبان البوتاسيوم مثل إنتاج الأحماض العضوية والسيدروفورات والسكريات،

إضافة الى قيام PGPR بإنتاج وتخليق بعض الهرمونات النباتية حيث تنتج النباتات العديد من الهرمونات النباتية كالجبرلين و السيتوكين وحمض الاندول الخلي IAA والاثيلين وحمض الصفصاف Salicylic acid وغيرها ولكن تنتجها بكميات غير كافية للنمو بالشكل الأمثل وقد وجد العلماء أن معاملة البذور أو الجذور ببعض الكائنات الحية الدقيقة أدى الى تحسن في نمو النبات وذلك لأنها تنتج الهرمونات وتوصل Wahyudi (2011) الى تشخيص 14 عزلة غير ممرضة للنبات تقوم بانتاج هرمون IAA وتعمل على تحفيز نمو النبات وتزيد من أعداد الجذور الجانبية (Wahyudi & Astuti, 2011). وعلى الرغم من ان لبكتيريا BGPR فوائد كثيرة للزراعة والبيئة، لكنها قد تحمل أيضا بعض السلبيات، كتفاعلها مع بعضها البعض أو مع بكتيريا أخرى في التربة بطرق غير متوقعة أو غير مرغوبة. وقد تكون حساسة للظروف المحيطة، مثل درجة الحموضة أو الترطيب أو درجة الحرارة، وقد تفقد فعاليتها إذا لم تكن هذه الظروف مناسبة إضافة أنها قد تحتاج إلى إجراءات خاصة لإنتاجها وتخزينها وتطبيقها على النباتات، مثل إجراءات عوامل الخطورة (Glick & Glick, 2020).

هدف هذا البحث الى تحري عزلات محلية من المحيط الجذري لنبات القمح لأهمية الاستراتيجية ودراسة مقدرة هذه العزلات على إنتاج الأمونيا وحمض الأندول الخلي وإذابة الفوسفات وتحديد انتمائها الى محموعة PGPR من خلال ذلك ثم تعريف أفضل هذه العزلات .

مواد البحث وطرائقه:

1 .جمع العينات :

نفذت جولات حقلية شملت العديد من حقول محصول القمح المروي والبعل من عدة مواقع ومحافظات في سورية وذلك خلال عامي (2018–2019) وهدفت الجولات إلى دراسة وجمع بكتيريا المحيط الجذري من نباتات قمح او شعير سليمة ظاهريا والمجاورة للنباتات المصابة، و تم جمع العينات على مرحلتين

المرحلة الأولى: امتدت من نيسان إلى نهاية شهر حزيران جمعت نباتات القمح أو شعير التي لا يبدو عليها أعراض الإصابة (نباتات القمح السليمة ظاهريا) وشملت الجولات المحافظات دمشق – ريف دمشق .

أما المرحلة الثانية حيث جمعت عينات تربة من حقول مختلفة بهدف زراعة بذور القمح فيها وعزل البكتيريا من منطقة المحيط الجذري شملت جمع العينات المحافظات دمشق – ريف دمشق – درعا .

تم جمع 10 عينة من نباتات لا تبدو عليها أعراض الإصابة (سليمة ظاهرياً) موجودة إلى جانب نباتات أخرى مصابة بالأمراض او مجهده ظاهرياً.

2 عزل البكتيريا :

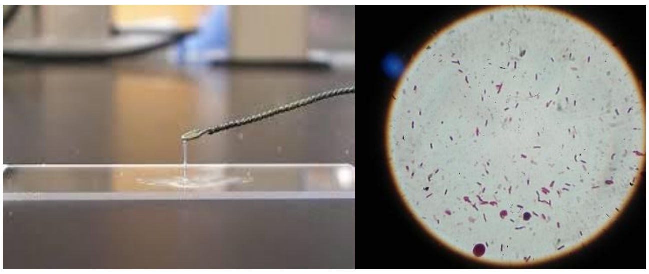
تم عزل البكتيريا من المحيط الجذري بفصل الجذور وغسلها بماء الصنبور ثم بالماء المقطر بشكل جيد ثم قطعت الجذور إلى قطع صغيرة 2–3 سم ووضعت في أنابيب تحوي 10مل ماء مقطر معقم ثم رجت الأنابيب لمدة 5 دقائق ، وذلك لفصل البكتيريا الموجودة في منطقة المحيط الجذري أو الملتصقة على سطح الجذور، ثم اخذ 1مل من المعلق وتم تمديده 3 مرات(1/10 – 1/100– 1/1000) وبعدها تم أخذ قطرة بحجم 30 ميكروليتر وتركيز 10^7 /CFU نشرت على سطح طبق بتري يحتوي على مستنبت (YPGA) (غلوكوز 7غ–بيبتون7غ– مستخلص خميرة 7غ– أغار 14غ أضيف لها لتر ماء معقم) أو على مستنبت (KINGB) (ببتون 20غ– غليسرول 10غ– سلفات المغنيزيوم 1,5غ– أغار 18غ أضيف إليها لتر من الماء المقطر المعقم عقم عند درجة حرارة 120س° لمدة 30 دقيقة بالأوتوغلاف) وتم تحضين الأطباق عند درجة حرارة 25س° ولمدة 3 أيام .

تم تنقية مستعمرات مختلفة من الأطباق بحسب لونها وقطرها وشكلها (محدبة – مسطحة – منتظمة – غير منتظمة) وزرعت على أطباق جديدة للحصول على مستعمرة نقية وتم حفظ العزلات المختارة في بيئة حافظة PYDAC : (peptone 3 g L, yeast extract 3 g L−1, glucose 5 g L, calcium carbonate 40 g L, agar 15 g L)(أبو غرة والدوجي،1996) وتم استخدام عزلات مختارة من مخبر الممرضات البكتيرية في كلية الزراعة جامعة دمشق والتي قام الباحث علي عثمان بعزلها واختبارها من حيث مساعدتها للنباتات على تحمل الاجهاد الملحي والمحفوظة بنفس الطريقة .

3 تعريف البكتيريا بالطرق الكيميائية :

- **إختبار غرام:**

تم وضع قطرة من المعلق البكتيري على شريحة ويثبت المعلق بالتسخين يُصبغ المحضر بالكريستال البنفسجي لمدة 1 دقيقة ، ثم يُغسل المحضر باليود ثم بالماء ثم بالكحول 95% حتى يصبح الكحول عديم اللون ، يُغسل المحضر بالماء المقطر ، ثم يصبغ المحضر بالصفرانين لمدة 2 إلى 3 دقائق ويغسل بالماء ويفحص بالعدسة الزيتية ، قراءة الاختبار: البكتيريا موجبة غرام تظهر بلون بنفسجي داكن ، البكتيريا سالبة غرام تظهر بلون وردي أو أحمر (Suslow et al., 1982) كما في الشكل (1).



الشكل رقم (1) بكتيريا سالبة غرام

- **اختبار الأوكسيداز:**

تستخدم أقراص من شركة Bio Merieux الحاوية على الكاشف . حيث تنقل المستعمرة بحلقة التلقيح إلى القرص. يدل ظهور اللون البنفسجي على أن الاختبار موجب (Harrigan, 1998)

- اختبار متطلبات البكتيريا من الأوكسجين الحر (Hugh and Leifson, 1953)

الشكل (2): اختبار الأوكسجين الحر (+) (−)

- **اختبار مقدرة البكتيريا على تشكيل الأبواغ الداخلية Endospores :**

يتم وضع ماء مقطر ومعقم في عدة أنابيب اختبار صغيرة بمقدار 5 مل في كل أنبوب، ثم يضاف إليها بواسطة إبرة معقمة قليلاً من الخلايا البكتيرية ، ومن ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 80 س° لمدة عشرين دقيقة ، بعدها تم أخذ قطرات من كل أنبوب وتزرع على أطباق بتري تحوي بيئة آغار مغذي BHI وتُحضن عند درجة حرارة 28 س° لمدة 48 ساعة ، وجود نمو بكتيري يدل على قدرة البكتيريا على تشكيل الأبواغ (أبو غرة والدوجي،1996) .

- **اختبار السكريات الثلاثية والحديدTriple sugar iron agar :**

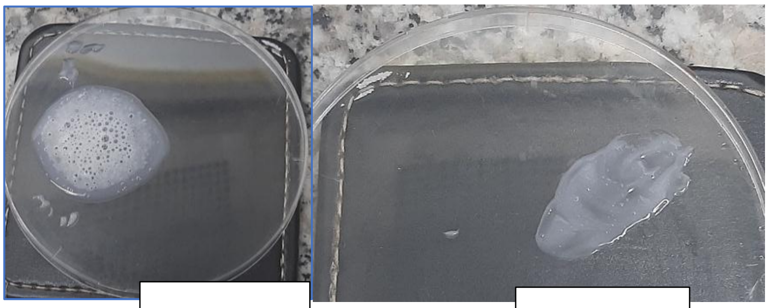
حيث يشير تغير اللون من الأحمر الى الأصفر الى إن البكتيريا قامت بتخمير السكريات سواء في قعر الأنبوب أو على السطح المائل (هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية، 2001).

الشكل رقم (3) تبين اختبار الTSI للعزلتين (28.2,41.4)

- **اختبار الكاتالاز :**

وهو يوضح قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكاتالاز الذي يقوم بتحرير الاوكسجين وفق المعادلة التالية:

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2$ (أبو غرة والدوجي،1996) الشكل رقم (4)



الشكل (4) اختبار الكا

4- استخلاص الـ DNA وتطبيق الـ PCR وتحديد التتابع النكليوتيدي:

عزل الـDNA البكتيري من مستعمرات بكتيرية بعمر 24 ساعة باستخدام DNA wizard isolation and purification kit من شركة Promega وفق تعليمات الشركة الصانعة Wizard ® Genomic DNA Purification Kit-Technical Manual، حُددت سلامة ونوعية الـ DNA و نقاوته باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند اطوال موجات A260/A230 نانومتر.

حضر تمديدات الـ DNA بتركيز 10نانوغرام/ميكرولتر كما في الشكل رقم (5). و تطبيق اختبار الـ PCR وتحديد التتابع النكليوتيدي في مركز البحوث الإيطالية في مدينة ميلانو –إيطاليا

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

الشكل رقم (5) يوضح استخلاص خيوط الـ DNA

حيث أُجري تفاعل الـ PCR باستخدام 5 ميكروليتر من الـ DNA باستخدام زوج بادئات (f 8-27 و r 1492−1510) عام متخصص يمورثات 16S rRNA (Lane .1991) 2 ميكروليتر لكل بادئ وبتركيز (10 poml/ µl) وبحجم نهائي 50 ميكروليتر.

وكان البادئ المباشر (f 8-27) بتسلسل نكليوتيدي : 3′- 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

والبادئ غير المباشر (1510-1492) 3′ - GGCTACCTTGTTACGACTT -5′ واستخدم 25ميكروليتر من (Biocompare GoTap G2-Hot Start Green Master Mix) (وفق تعليمات الشركة Promega) ، وأكمل الحجم بإضافة 21 ميكرولتر من الماء المقطر المعقم.

اجري تفاعل DNA باستخدام جهاز PCRالمصنع من قبل شركة BIORAD ، وفق البرنامج التالي: حيث قمنا بالمرحلة الأولى بفصل سلسلة الـDNA عند درجة حرارة 95 س° لمدة خمسة دقائق، و التفكيك الثانوي بعدة دورات متكررة (35دورة) على درجة حرارة 95 س لمدة دقيقة واحدة. ومن ثم مرحلة ارتباط البادئات عند درجة حرارة 65 س لمدة 45 ثانية فقط، ثم مرحلة استطالة البادئات على درجة حرارة 72س لمدة دقيقة ونصف، وبالنهاية القيام بالاستطالة النهائية على درجة حرارة 72 س لمدة خمسة عشر دقيقة.

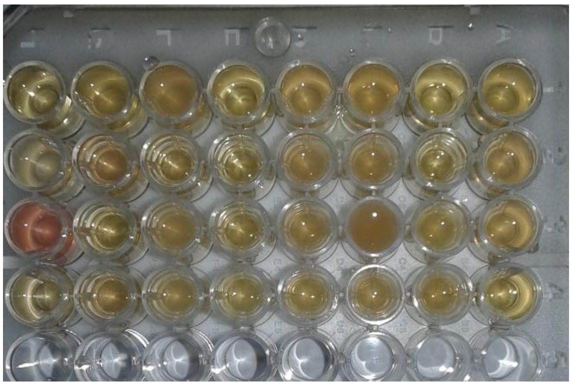
ثم تم ترحليها ضمن هلامة Agarose (تركيز 1%)، وباستخدام محلول منظم للرحلان (TBE 1X)، واستخدام (Agrobacterium.vitis) كشاهد موجب والماء المقطر المعقم كشاهد سالب، بالمقارنة مع Ladder DNA Plus 1Kb المؤشر الجزيئي. تم تنقية نواتج تفاعل PCR باستخدام,(QIAquick ,Germany,Hilden) تبعا لإرشادات الشركة المصنعة لتحديد الـ DNA في كال الاتجاهين باستخدام زوج من البادئات العامة (f 8-27 و r 1492−1510) (Macrogen Korea) تم فحص DNA البكتيريا عند طول موجة A260/A230 وحسبت الـOD ، وحدد التتابع النكليوتيدي بصيغة ملف (ab1)، تم تم تحديد نوع البكتيريا باستخدام قاعدة بيانات BLAST من موقع NCBI البنك الوراثي.

5- اختبارات محددة لصفات البكتريا الجذرية (PGPR) :

أ- اختبار قدرة البكتريا على انتاج حمض الأندول الخلي .

تم اختبار البكتيريا حسب (Rahman et al., 2010)حيث تم زراعة البكتيريا على بيئة YMA بعدها أخذ قرص بقطر 8ملم من البكتيريا النامية وزرعت في انبوب يحوي 5 ملم من بيئة (Yeast Malt Extract Broth (YMB مضاف اليه L- tryptophan بتركيز 2غ/ل وحضنت عند درجة حرارة 30 س° لمدة 48 ساعة ثم فصلت الرشاحة بعملية الطرد المركزي عملية الطرد المركزي 10000 دورة/دقيقة .

وللكشف عن وجود حمض الاندول الخلي تم مزج 1 مل من الرشاحة مع 2 مل من كاشف Salkowski's المكون من 15مل (fecl$_3$(o,5 M و30 مل من H_2so_4 وكان ظهور اللون الوردي بعد 25 – 30 دقيقة دليل على وجود الاندول الخلي IAA كما في الشكل (1)



الشكل رقم (6) يظهر اختبار الاندول

ب- اختبار الأمونيا :

تم تقييم إنتاج الامونيا NH3 بالطريقة النوعية لـ (Cappuccino and Sherman, 1992)

تحضين البكتريا في وسط البيبتون السائل (10 غ بيبتون- 5غ كلوريد الصوديوم) , وبعد التحضين نقوم بإضافة المشعر (Nessler reagent 0.5 ml) بمعدل 2:1 ظهور اللون البني المصفر دليل نتيجة ايجابية للاختبار (Das et al., 2016). كما في الشكل رقم (7)

الشكل رقم (7) اختبار الأمونيا

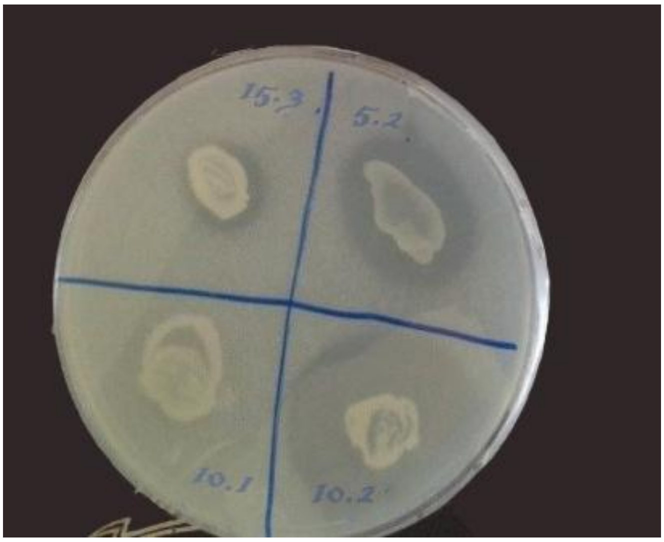
ت- اختبار الفوسفات :

حسب طريقة :Pikovskaya (PVK)

وسط PKA

10 غ غلكوز – 5 غ ثلاثي فوسفات الكالسيوم – 0.5 غ مستخلص خميرة –0.5 غ سلفات الأمونيوم – 0.2 كلوريد البوتاسيوم – 0.2 كلوريد الصوديوم– 0.1 سلفات المغنيزيوم– 15 غ أغار والتحضين على درجة حرارة 28م ولمدة أسبوع (PIKOVSKAYA, 1948).

(النتيجة الإيجابية : تشكيل هالات حول العزلات البكتيرية) كما في الشكل رقم (8).



الشكل رقم (8) تشكل هالات حول المستعمرات البكتيرية المذيبة للفوسفات

النتائج والمناقشة:

تم اختبار العزلات البكتيرية من عشر عينات من مناطق مختلفة وتم الحصول على 22 عزلة بكتيرية وكانت النتائج كما في الجدول رقم (1)

جدول رقم (1) يبن عدد العزلات البكتيرية وأرقامها .

3.3	3.4	7.1	8.4	9.1	10.1	10.2	11.1	13.3	13.31
14	14.1	14.11	14.2	14.3	14.4	14.5	14.6	14.6.1	15.3.1
								15.3.2	15.4

كما تم دراسة العزلات : 4.3– 5.2– 41.4 المأخوذة من مختبر الامراض البكتيرية والمعزولين من قبل الباحث علي عثمان .

إنتاج الأندول :

أظهرت نتائج اختبار العزلات 22 أن 6 عزلات انتجت حمض الأندول IAA وهي كما في الجدول رقم (2)

جدول رقم (2) يبين العزلات المنتجة لحمض الأندول الثلجي وشدة اللون لكل عزلة .

العزلات البكتيرية	10.2	10.1	14	14.6	15.32
شدة اللون	+++	++	++	+	+
العزلات البكتيرية	15.4	4.3	5.2	41.4	
شدة اللون	+	+++	+++	+++	

حيث تدرجت شدة اللون بين الزهر الفاتح والوردي الغامق المحمر وعليه تم وضع سلم قياس شدة اللون حيث تشير + الى اللون الوردي الفاتح و+++ اللون الوردي الغامق او المحمر,

وكانت أفضل العزلات إنتاجا للأندول هي 10,2 -10,1- 14 بينما تفوقت العزلات المرجعية المأخوذة من مختبر الأمراض جميعها في إنتاج الأندول وبالمقارنة بين هذه العزلات والعزلات المدروسة كانت العزلة 10.2 هي الأكثر تميزا IAA

اختبار تحليل الفوسفات :

تم اختبار العزلات من حيث القدرة على تحليل الفوسفات وأظهرت النتائج ان خمس عزلات أعطت نتائج إيجابية من حيث تحليل الفوسفات وكما في الجدول رقم (3)

جدول رقم (3) يبين العزلات المحللة للفوسفات ومعامل الذوبان لكل عزلة

العزلات البكتيرية	10.1	10.2	14	14.2	15.3.1	4.3	5.2	41.4
معامل الذوبان	2.7	4.1	4	4.7	3	4.1	3.6	3.9

وتم حساب معامل الذوبان وفق المعادلة التالية :

$$\text{معامل الذوبان} = \frac{\text{قطر المستعمرة+قطر الهالة}}{\text{قطر المستعمرة}}$$ (Jadoon et al., 2019).

من خلال اختبار العزلات 22 تبين أن خمس عزلات فقط كانت إيجابية لتحليل الفوسفات وتراوح معامل الذوبان للفوسفات بين 2,7 –4.7 ومن خلال المقارنة مع العزلات الشاهد تبين تساوي العزلة 10,2 مع العزلة 4,3 من حيث معامل الذوبان حيث أعطت هذه العزلتان معامل ذوبان وقد بلغ 4,1 بينما كان اقل معامل ذوبان للعزلة 10,1 وبلغ 2,7 ونلاحظ أن العزلة 14.2 أعطت اعلى معامل ذوبان حتى بالمقارنة مع العزلات المرجعية من مختبر الأمراض البكتيرية حيث بلغ معامل الذوبان 4,7 .

انتاج الامونيا :

وبينت النتائج أن 9 عزلات انتجت الأمونيا من اصل 22 عزلة المختارة إضافة الى العزلات المقارنة وكانت النتائج وفق الجدول رقم (4):

جدول (4) يوضح العزلات المنتجة للأمونيا

العزلات البكتيرية	7.1	10.2	11.1	14	14.2	14.3	14.4	15.3.2
شدة اللون	+	+++	+++	+	+	++	+++	++
العزلات البكتيرية	15.4	4.3	5.2	41.4				
شدة اللون	+++	++	+++	++				

ومن خلال الجدول أعلاه نلاحظ تميز عدد من العزلات مثل 10.2–11.1–14.4– 15.4 في انتاج الامونيا .

في حين تميزت العزلة 5,2 فقط من العزلات المرجعية أو المقارنة في حين تساوت نتائج العزلات 14,3 – 15,3.2 مع العزلتين المرجعيتين 4,3–41,1 .

ومن خلال النتائج السابقة نلاحظ تفوق العزلة 10,2 بإنتاج حمض الاندول الخلي وتحليل الفوسفات وإنتاج الأمونيا.

حيث أعطت افضل النتائج في الاختبارات السابقة وتفوقت في بعض الاختبارات على العزلات المرجعية .

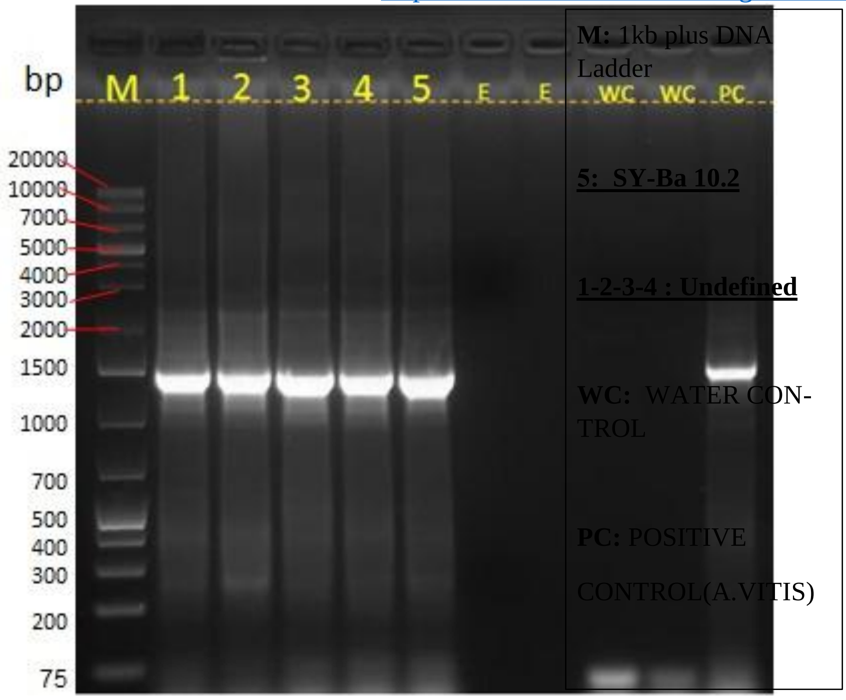
نتائج الاختبارات البيوكيميائي للعزلة 10.2 :

بناءا على النتائج السابقة تم انتخاب العزلة 10.2 لتعريفها وتصنيفها .

بينت نتائج الاختبارات البيوكيميائية ان العزلة 10.2 هي بكتيريا سالبة غرام عصوية هوائية لاهوائية اختيارية موجبة لاختبار الكتالاز ولاتشكل ابواغ كما انها تخمر السكاكر الثلاثية(TSI) ميل احمر وقاع اصفر دليل تخمير الجلوكوز وعدم تخمير اللاكتوز أو السكروز ولا تنتج غاز الكبريت,

التعريف الجزيئي للعزلة 10.2 :

بينت نتائج الرحلان الكهربائي للدنا ضمن هلامة (Agarrose) وجود حزمة ذات وزن جزيئي 396471.81 Da والتي تم التحري عنها وفق مقياس 1kb plus DNA Ladder، وأن الـ DNA لبكتيري المدروسة سليمة حسب https://www.bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html



الشكل (9) صورة للرحلان الكهربائي لـDNA للعزلة(ل SY_Ba 10.2)

تم الحصول على نتائج تسلسل النيكليوتيدات باستخدام تقنية PCR والذي بلغ 1287 نيكليوتيد لكامل الجينوم البكتيري.

تحديد التسلسل النكليوتيدي :

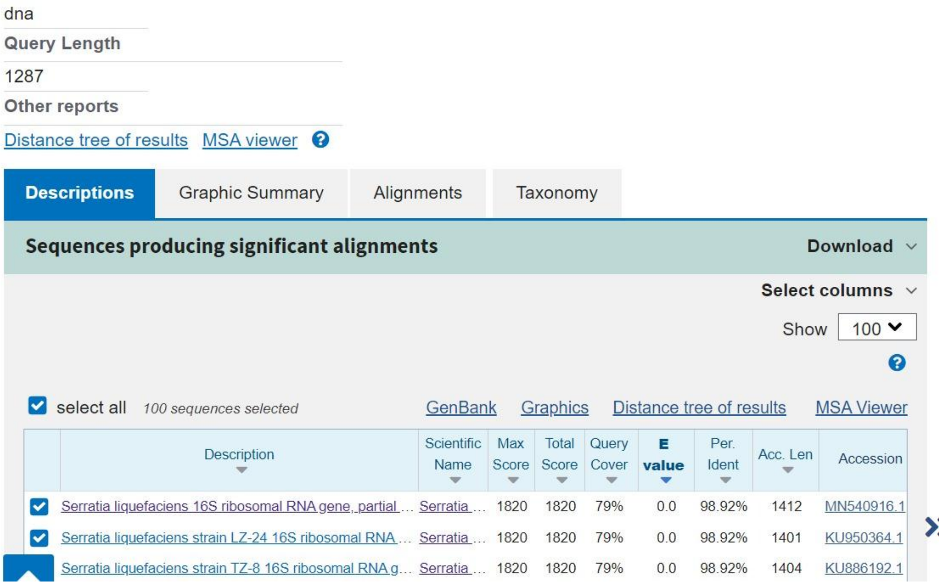
تم تحديد التتابع النكليوتيدي للقطعة المضخمة باستخدام بادئات 16S rDNA

TGGGGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACG
GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTA
CGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCC
GGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGTTCGCTTCT
CTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCAT
GATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTC
CTTTGAGTTCCCGCCATTACGCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCT
CGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCACAACACGAGCTGACGACAGCCAT
GCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAAT
TCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAA
CCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTA

ACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGA
AGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGC
GTCAGTCTTTGTCCAGGAGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATC
TCTACGCATTTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACT
CTAGCTTGCCAGTTTCACATGCAGTTCCCACGTTAAGCGCGGGGATATCA
CATCTGACTTAACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCACAGTAATTCCTA
TTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCC
GGTGCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATGAACAGAGATATGAGCACTGAAC
CCTTCCTCCTCGCTGAGAGTGCAATAGGAGCCGAAAGCCCTCCTGCCCCC
CCCCACCCTGTTTGTTTGGGGCTGCGCCGATTGGGGCAGAATACCCAATG
CCCCCTCCGGTAGAAAAAAGAAGAGAGGGTGGGGTGCGAATTAGTTTGGT
GTGGTGGTCAAAAAAAGAAGAGGAAACACCGGTGGGTGGGGCGGTAGAGA
AAACAAAAAACCCCCCCCCCGGGGGCCCCCGCGGGGGTTAAAGGGGGGG
GGGGGGGGGGGGGCTCCCCCTTTTTCCCCTTAATAT

ولدى مقارنة تسلسل النيكليوتيدات بالبنك الوراثي لموقع الوراثي(NCBI) BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov).

تبين ان العزلة البكتيرية تنتمي الى عائلة Enterobacteria جنس Serratia وتتشابه مع النوع Serratia liquefaciens بنسبة تشابه بلغت 98.92% ونسبة تغطية بلغت 78% كما في الشكل رقم (10).


dna
Query Length
1287
Other reports
Distance tree of results   MSA viewer

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments   Download

Select columns

Show 100

select all   100 sequences selected   GenBank   Graphics   Distance tree of results   MSA Viewer

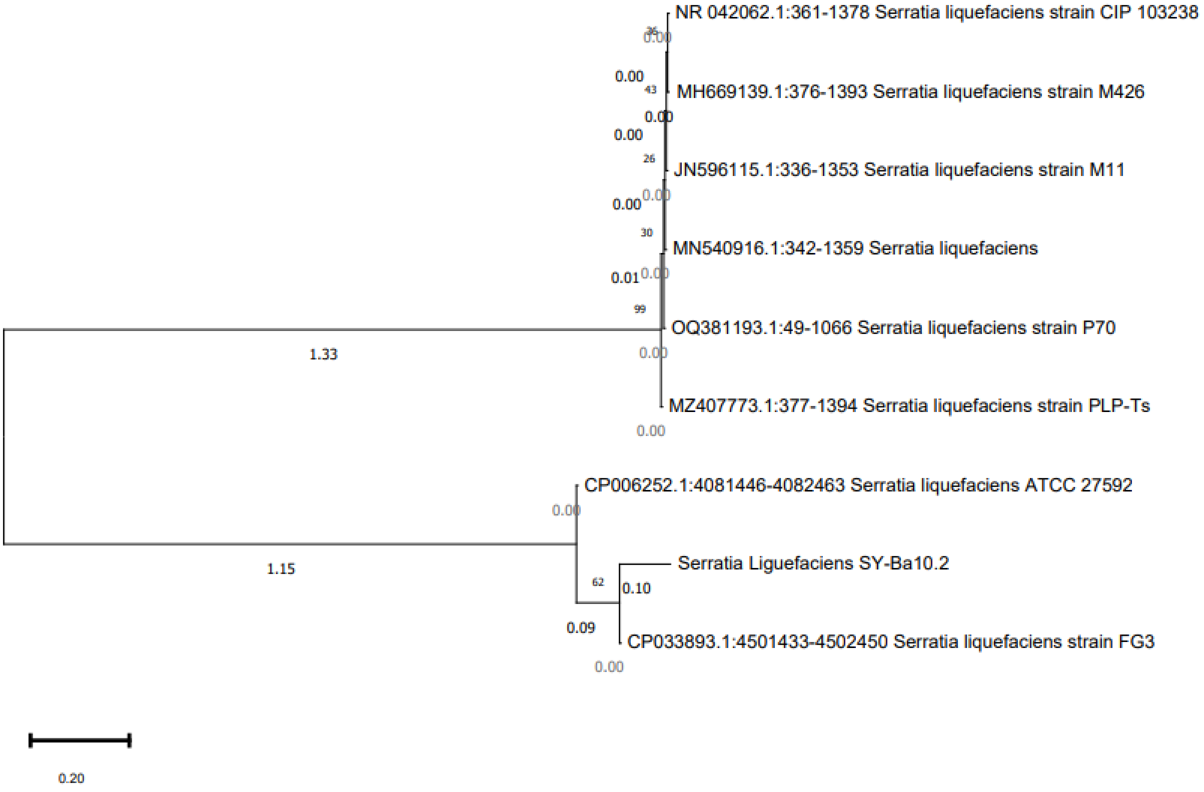
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☑	Serratia liquefaciens 16S ribosomal RNA gene, partial …	Serratia …	1820	1820	79%	0.0	98.92%	1412	MN540916.1
☑	Serratia liquefaciens strain LZ-24 16S ribosomal RNA …	Serratia …	1820	1820	79%	0.0	98.92%	1401	KU950364.1
	Serratia liquefaciens strain TZ-8 16S ribosomal RNA g…	Serratia …	1820	1820	79%	0.0	98.92%	1404	KU886192.1

الشكل رقم (10) مقارنة التسلسل النيكليوتيدي للعزلة 10.2 بالبنك الوراثي

بناءاً على نتائج البنك الوراثي وباستخدام طريقة (Neighbor-Joining method)الإحصائية التي قدمها Saitou عام 1987. تم رسم شجرة القرابة للعزلة SY-Ba 10.2 مع السلالات الأكثر تشابها لها للوصول الى التقارب الوراثي بين العزلة(10.2) وثمان سلالات بكتيرية تتبع الى النوع البكتيري Serratia liquefaciens .

أُجريت هذه التحليلات الوراثية باستخدام برنامج MEGA11 (Tamura et al., 2021) و تم حساب مسافات التقارب الوراثي على شجرة القرابة باستخدام طريقة الإحصائية (Maximum Composite Likelihood)

بينت شجرة القرابة وجود فرعين أساسيين حيث ضم العنقود الأول ستة سلالات بكتيرية تابعة لنوع Serratia liquefaciens (CIP,M426,M11,p70,PLP-TS)اما العنقود الثاني يضم تحت عنقودين الأول منهما يحوي السلالة ATCC اما الثاني فيحوي كل من السلالتين FG3 , Ba 10.2



الشكل رقم (11) شجرة القرابة الوراثية للعزلة Ba 10.2

كما بينت مصفوفة التشابه الناتجة للعزلة المدروسة وأكثر العزلات تشابهاً معها حسب موقع SIAS (Sequence Identity And Similarity) (http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html) بأن أقرب سلالتين هما ATCC بنسبة تشابه بلغت 98,91% و FG3 بنسبة تشابه 98,72% مع العزلة المدروسة SY-Ba10,2

وهذا ما يتوافق مع ما قدمه Kshetri وزملاؤه عام 2019 حيث أكدوا على ان S.Liquefaciens ومعظم جنس Serratia spp هي بكتيريا PGPR مستعمرة لجذور النباتات ومحفزة لنموه، من خلال تسهل امتصاص المغذيات مثل الفوسفور عن طريق إذابة الفوسفات وإنتاج السيدروفور وانتاج هرمونات نباتية محفزة مثل حمض الإندول الخلي (IAA)الى جانب تحريض المقاومة الجهازية المستحثة (ISR) حيث يتم الحصول على تعزيز القدرة الدفاعية للنبات ضد مسببات الأمراض والآفات النباتية المتنوعة بعد التحفيز المناسب. (Kshetri et al., 2019)

وفي دراسة اجراها Zahir وزملاؤه حول تلقيح بذور القمح ببكتيريا Serratia أدت الى زيادة طول النبات وانتاجيته ومحتوى الكلوروفيل من خلال تيسير وإتاحة المغذيات من فوسفات وحديد وأمونيا إضافة الى زيادة في طول الجذور من خلال دورها في انتاج الأندول (Zahir et al., 2009)

كما قام Yousaf ورفاقه بإجراء تقييم لتأثيرات البكتيريا الجذرية المعززة لنمو نبات للقمح والملفوف على نمو نبات القمح من قبل ، حيث تم عزل ما مجموعه 49 بكتيريا وتمييزها عن جذور نباتات القمح تم تقييم العزلات من حيث الخصائص المحفزة لنمو النبات مثل: إنتاج حمض الأندول الخلي ، إذابة الفوسفات ، .وانتجت 7 عزلات حمض الأندول الخلي IAA وأظهرت 20 عزلة إذابة الفوسفات وبينت النتائج أن التلقيح الجذري زاد من عدد الجذور والبراعم والأوراق والجذور وطول نبتة القمح مقارنةً بالشاهد(Yousaf et al., 2020).

في حين اكد Selvakumar وملاؤه عام (2008) أن Serratia marcescens كانت قادرة على تحليل 76.6 مايكروغرام/مل من الفوسفور وإنتاج حمض الأندول الخلي (IAA) (11.1 مايكروغرام/مل). كما تم اكتشاف إنتاج سيانيد الهيدروجين عند 15 درجة مئوية. واحتفظت السلالة بجميع صفات تعزيز نمو النباتات عند 4 درجات مئوية. أدى تلقيح البذور بالسلالة إلى زيادة كبيرة في كتلة النبات وامتصاص المغذيات لبادرات القمح المزروعة في درجات حرارة باردة. (Selvakumar et al., 2008) .واكد González-Ista أن العزلة Serratia. H6 الاتصال المباشر للبكتيريا بالنبات والمركبات العضوية المتطايرة في Serratia. H6 كانت هي الآليات الرئيسية لتعزيز نمو نبات ، (González-Ista et al., 2023)

وهذه النتائج تدعم كون العزلة 10.2 تنتمي الى جنس serratia والتي اثبتت الأبحاث ان لها دور محفز لنمو النبات من حيث تحليل الفوسفات وإنتاج الاندول وهذا ما أكده González-Ista ورفاقه عام 2023 حيث تنتمي هذه البكتيريا الى جنس Serratia إلى عائلة Enterobacteriaceae وقد تم وصف العديد من أنواعها على أنها البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات(PGPR) ولقد لاقى جنس Serrata اهتمامًا هائلاً من قبل الباحثين حيث أظهرت هذه السلالات إمكانات عالية للتخصيب الحيوي وتعزيز نمو النبات ، مما يساهم في زيادة إنتاجية المحاصيل الحقلية والزراعية المتنوعة. اكتسبت بعض الأنواع مثل S. plymuthica و S.Liquefaciens و S. proteamaculans و S. grimesii و S. nematodiphila و S. rubidaea اهتمام خاصاً نظرًا لفوائدها على النباتات. (Kshetri et al., 2019).

الاستنتاجات :

خلال دراسة 22 عزلة بكتيرية من المحيط الجذري للقمح في عدة مناطق سورية أظهرت (10) عزلات منها خصائص ايجابية لواحد او أكثر من الصفات المختبرة ضمن معايير البكتيريا الجذرية المعززة لنمو النبات PGPR . من بين هذه العزلات تفوقت العزلة 10.2 من حيث تحليل الفوسفات وإنتاج حمض الاندول الخلي وإنتاج الامونيا وبنتيجة التحليل البيوكيميائي والجزيئي ورسم شجرة القرابة تبين انها تنتمي تنتمي لجنس serratia وتم تعريفا على انها Serratia liquefaciens SY- Bal 10.2

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

References:

1. أبـو غـرة، محمـود والـدوجي، زيـاد الصـواف. (1996–1997). أمـراض النبـات البكتيريـة (النظـري والعملـي)، منشورات جامعة دمشق. ص (432–440).
2. AlAli, H. A., Khalifa, A., & Almalki, M. (2022). Plant growth-promoting bacterium from non-agricultural soil improves okra plant growth. Agriculture, 12(6), 873 .
3. Berde, C. V., Gawde, S. S., & Berde, V. B. (2021). Potassium solubilization: Mechanism and functional impact on plant growth. Soil Microbiomes for Sustainable Agriculture: Functional Annotation, 133-148 .
4. Cappuccino, J. G. and N. Sherman.1992. Biochemical activities of microorganisms. In: Microbiology, A Laboratory Manual. The Benjamin / Cummings Publishing Co. California, USA
5. Das, B., Sarma, H. K., Konwar, G., Saikia, J., & Rabha, J. (2016). Screening and Identification of traits in plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soils of Persea bombycina. Biotechnology and Biochemistry 2(2), 11-18 .
6. Glick, B. R. (2020). Introduction to plant growth-promoting bacteria. Beneficial plant-bacterial interactions, 1-37 .
7. González-Ista, N. S., Castro-Mercado, E., la Cruz, H. R.-d., Campos-García, J., López-Bucio, J., & García-Pineda, E. (2023). Comparison of the Rhizobacteria Serratia sp. H6 and Enterobacter sp. L7 on Arabidopsis thaliana Growth Promotion. Current microbiology, 80(4), 117 .
8. Harrigan, W. F. (1998). Laboratory methods in food microbiology. Gulf professional publishing .
9. Husen, E. (2020). Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro .
10. Igrejas, G., & Branlard, G. (2020). The importance of wheat. Wheat quality for improving processing and human health, 1-7 .
11. Jadoon, S., Afzal, A., Asad, S., Sultan, T., Tabassam, T., Umer, M., & Asif, M. (2019). Plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from potato (Solanum tuberosum L.) and their antifungal activity against Fusarium oxysporum. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences, 29 .(4)
12. Karthikeyan, L., Chawla, I., & Mishra, A. K. (2020). A review of remote sensing applications in agriculture for food security: Crop growth and yield, irrigation, and crop losses. Journal of Hydrology, 586, 124905 .
13. Kshetri, L., Naseem, F., & Pandey, P. (2019). Role of Serratia sp. as biocontrol agent and plant growth stimulator, with prospects of biotic stress management in plant. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management: Volume 2: Rhizobacteria in Biotic Stress Management, 169-200 .
14. Lengai, G. M., Muthomi, J. W., & Mbega, E. R. (2020). Phytochemical activity and role of botanical pesticides in pest management for sustainable agricultural crop production. Scientific African, 7, e00239 .
15. Pathania, P., Rajta, A., Singh, P. C., & Bhatia, R. (2020). Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 30, 101842 .
16. Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Microbiologiya, 17, 362-370 .

17. Rahman, A., Sitepu, I. R., Tang, S.-Y., & Hashidoko, Y. (2010). Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 74(11), 2202-2208 .
18. Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S., Gupta, A., Joshi, P., Nazim, S., & Gupta, H. (2008). Cold tolerance and plant growth promotion potential of Serratia marcescens strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (Cucurbita pepo). Letters in applied microbiology, 46(2), 171-175 .
19. Shewry, P. R., & Hey, S. J. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. Food and energy security, 4(3), 178-202 .
20. Suslow, T., Schroth, M., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72(7), 917-918 .
21. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution, 38(7), 3022-3027 .
22. Wahyudi, A. T., & Astuti, R. I. (2011). Screening of Pseudomonas sp. isolated from rhizosphere of soybean plant as plant growth promoter and biocontrol agent. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 6(1), 134-141 .
23. Yousaf, A., Khan, H. A., & Younas, T. (2020). Isolation of Plant Growth Promoting Bacteria from the Rhizosphere of Different Plants and Assessment of Their Plant Growth Promotion Potential: Isolation of Bacteria and their Assessment for Plant Growth Promotion Potential. Pakistan BioMedical Journal, 3 .(1)
24. Zahir, Z. A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S. M., & Asghar, H. N. (2009). Comparative effectiveness of Pseudomonas and Serratia sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (Triticum aestivum L.) under salt-stressed conditions. Archives of Microbiology, 191, 415-424 .