كلية التربية للعلوم الصرفة

التحري عن الآليات المعززة لنمو النبات من قبل بعض العزلات البكتيرية المستوطنة للتربة

مروة أسعد نايف علي السبعاوي

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

الأُستاذ

الدكتورة نجوى ابراهيم خليل البرهاوي

1447هـ

2025م

الخلاصة

أُنجزت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية للدراسات العليا العائد لقسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم الصرفة، بهدف التحقق من مدى كفاءة البكتيريا المعزولة من العقد الجذريَّة للنباتات البقولية في المعززة لنمو النباتات بدلالة بعض الفحوصات المختبرية لغرض التوصية باستخدامها كأسمدة حيوية لغرض الحد من استخدام الأَسمدة الصناعية الملوثة للبيئة، ولتحقيق هذا الهدف صُمِّمت التجارب ضمن محورين أَساسيين هما:

المحور الأوَّل :

تضمن دراسة بعض الآليات المباشرة التي تنتهجها البكتيريا المثبتة للنيتروجين الجوي والمعزولة من العقد الجذريَّة لستة أَنواع من النباتات البقولية وهي: الباقلاء *Vicia faba*، البرسيم *Trifolium alexandrinum*، العدس *Lens culinaris*، الحلبة *Trigonella foenum-graecum*، العدس البري *Lens culinaris* subsp. *orientalis*، والجت *Medicago sativa*، الَّتي أُعطيت لها الرموز الآتية:MA1، MA2 ، MA3 ، MA4 ، MA5 ، و MA6 ، على التعاقب. أَظهرت هذه العزلات عند تشخيصها مختبريا نتائج إيجابية لمعظم الاختبارات الكيميائية الحيويَّة الَّتي تضمنت : إِنتاج إِنزيم اليوريز Urease، التقاط أحمر الكونغوCongo-Red uptake، التقاط أزرق البروموثيمول BromoThymol Blue (BTB) uptake، تخمير اللاكتوز Lactose Fermentation والنمو على وسط أَكار الكلوكوز ببتونGrowth on Glucose Peptone Agar Medium، وكذلك في اختبارات نتائج تأثير الآليات المباشرة Direct Mechanisms والمتمثلة بكلا من: اختبار إنتاج الإندول Indole Production Test ، قياس نشاط أنزيم النيتروجينز Nitrogenase Activity، اختبار إذابة الفوسفات Phosphate solubilization test ،اختبار اذابة البوتاسيوم Potassium solubilization test ، واختبار إنتاج حاملات الحديد Production Test Siderophore . عليه ، يستدل من هذه النتائج ان البكتيريا المعزولة تميزت بكفاءة عالية فيما يتعلق بتزويد التربة بأَبرز العناصر الغذائيَّة اللازمة لنمو النبات. كما تمكنت جميع العزلات من إِنتاج حامض الإِندول-3-أسيتيك Indole-3-Acetic Acid (IAA) وبمستويات متفاوتة. من جانب آخر، تبيَّن أَنَّ كل العزلات البكتيريَّة لم تنجح بالنمو على وسط Glucose peptone

Agar Medium باستثناء العزلة MA6 التي تمكنت من النمو على هذا الوسط وبناءً على ذلك تعد العزلات من AM1 إلى AM5 هي من جنس *Rhizobium* والعزلة AM6 قد تكون من جنس آخر ولغرض التعرف على جنس هذه البكتيريا كُشِف عنها جزئيًا بتقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) وباستخدام البادئ العام للجين *16SrRNA*، وتبيَّن أَنَّها تتشابه بنسبة 95% مع العزلة العالمية *Serratia surfactantfacien*- YD25 المسجلة في بنك الجينات بالرقم NR.169468.1، ومن الجدير بالذكر أَنَّه سبق أَن عزلت هذه البكتيريا عالميًا بحسب المعلومات المتوفرة في بنك الجينات من دراستين أُجريتا في الصين وهذه المرة الثالثة التي عُزِلت ولأَوَّل مرة على المستوى المحلي .

المحور الثاني :

تضمن الاختبارات المتعلقة بالآليات غير المباشرة التي تقوم بها البكتيريا المعزولة من العقد الجذريَّة للنباتات البقولية ، لذلك ركَّزت هذه الدراسة في هذا المحورعلى استخدام البكتيريا المعزولة وبأنواعها الستة (MA1، MA2، MA3، MA4، MA5، وMA6)، كعوامل مكافحة حيوية ضمن ظروف المختبر ضد ثلاثة أَنواع مختلفة من البكتيريا الممرضة للنباتات وهي *Agrobacterium tumefaciens*، *Xanthomonnas campestris*، و *Lelliottia amnigena* ، شُخِّصت العزلتان الأُولى والثانية بدلالة اختبار الإمراضيَّة وتبين قدرتهما على تكوين مرض الأَورام التاجية على أَقراص الجزر وعلى إِحداث مرض ذبول الأَوراق disease Leaf blight على أَوراق نبات الملفوف، على التوالي. كما شخصت العزلة الأولى جزيئيا واظهرت تطابقا بنسبة 99% مع العزلة العالمية *A. tumefaciens* N5B(2) المسجلة بالرقم OK355397.1 ، وسجلت كعزلة جديدة في بنك الجينات *A. tumefaciens* MN3 واخذت التسلسل PV842272.1 . بينما شخصت العزلة الثالثة بدلالة إِحداثها لمرض العفن الطري Soft Mold Disease على كلا من درنات البطاطا وثمار العرهون ، فضلًا عن تشخيصها جزيئيًا في هذه الدراسة وتبيَّن أَنَّها مطابقة بنسبة 95% مع العزلة العالمية *L. amnigena* BW102 والمسجلة بالرقم PQ803913.1 في بنك الجينات ، لذلك سجلت كعزلة جديدة في بنك الجينات وباسم *Lelliottia amnigena* MN2 واخذت التسلسلPV030017 .

أُنجِز هذا المحور باتجاهين ، تمثل الاتجاه الأوَّل بدراسة التأثير التثبيطي لهذه البكتيريا المعزولة من العقد الجذريَّة على نمو البكتيريا الممرضة للنبات بالاعتماد على اختبار الفعالية التضادية Antagonistic Activity Test الَّتي أُنجزت بحسب طريقة التصالب المتقاطع Cross-Streak Method ، وأَظهرت العزلة MA2 أقوى تأثير مثبط ضد جميع أَنواع البكتيريا الممرضة، تلتها العزلة MA5 . في المقابل، أثرت العزلات المتبقية (MA1، MA3، MA4، و MA6) فقط على نمو العزلتين *X. campestris* و MN2 *L. amnigena* ، وقاومت بكتيريا MN3 *A. tumefacien* التأثير التثبيطي للعزلتين MA1 و MA6 . وتمثل الاتجاه الثاني بدراسة تأثير الجزء الطافي الخالي من الخلايا البكتيريَّة Cell-Free Supernatent (CFS) على نمو البكتيريا الممرضة للنبات وذلك بطريقة الانتشار بالحفر Agar well Diffusion Method ، وبينت النتائج أن حساسية هذه البكتيريا تجاه CFSs كانت متفاوتة وبلغت النسب المئوية 67 ،34 و17% لكل من MN3 *A. tumefacien* و *X. campestris* و MN2 *L. Amnigena* ، على التوالي.

اختِير CFS العائد للعزلة MA6، كونه أَفضل من الرواشح الخمسة الباقية في تأثيره على الأَنواع الثلاثة من البكتيريا المرضيَّة ، لغرض تحليله والتعرف على محتوياته من المواد الفعالة بواسطة جهاز كروماتوكرافيا الغاز – مطياف الكتلة Gas Chromatography-Mass Spectrometry(GC-MS)، ووجد أنه يحتوي على أربعة مركبات نشطة ذات الصيغ الكيميائية الآتية: $C_7H_{13}NO_2$ ، $C_{11}H_{18}N_2O_2$ ، $C_{28}H_{53}NO_3$ ، و $C_{21}H_{39}NO_3$ ، وبلغت أوزانها الجزيئية القيم الآتية: 143، 210، 451، 353 ، على التوالي. علمًا بأَنَّه لم نعثر على دراسة بينت تواجد هذه المركبات في الجزء الطافي الخالي من الخلايا البكتيريَّة المعزولة من العقد الجذريَّة ، عليه تُعَدُّ هذه أَوَّل دراسة يحصل فيها تحديد المواد الفعالة على اعتبار أَنَّها موادّ أَيض ثانوي خارج خلوي.

تُسهم هذه النتائج في التوصية بضرورة استخدام هذه العزلات، فضلًا عن التأكيد على استخدام العزلة *S. surfactantfacien*، كسماد حيوي صديق للبيئة ولتعزيز نمو النباتات ، وفي مقاومة المسببات المرضيَّة للنبات وذلك من أَجل تحسين الإِنتاج الزراعي والمحاصيل بشكل مستدام.

Abstract

This study was carried out in the postgraduate molecular genetics laboratory of the Department of Biology at the College of Pure Sciences Education, with the aim of investigating the efficiency of bacteria present in the root nodules of leguminous plants in promoting plant growth, as indicated by laboratory tests. The goal was to recommend using these bacteria as biofertilizers to reduce the use of industrial fertilizers, which pollute the environment. To achieve this goal, the experiments were designed along two main axis :

The first axis:

Some direct mechanisms used by atmospheric nitrogen-fixing bacteria isolated from the root nodules of six species of leguminous plants: Pea (*Vicia faba* L.), clover (*Trifolium alexandrinum* L.), lentil (*Lens culinaris* L.), fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), wild lentil (*Lens culinaris* subsp. *Orientalis* L.), and alfalfa (*Medicago sativa* L.). These bacteria were given the following codes: AM1, AM2, AM3, AM4, AM5, and AM6, respectively. Upon laboratory diagnosis, these isolates showed positive results for most biochemical tests including: Urease production, Congo-Red uptake, BromoThymol Blue (BTB) uptake, Lactose Fermentation and Growth on Glucose Peptone Agar Medium, as well as in the Direct Mechanisms results tests, namely: Indole Production Test, Measurement of Nitrogenase Activity, Phosphate solubilization test, Potassium solubilization test, Potassium solubilization test, and Siderophore Production Test. Therefore, these results indicate that the isolated bacteria were characterized by high efficiency in providing the soil with the most important nutrients needed for plant growth. All isolates were able to produce Indole-3-Acetic Acid (IAA) at varying levels. On the other hand, it was found that all bacterial isolates did not succeed in growing on Glucose Peptone Agar Medium except for isolate MA6, which was able to grow on this medium. Accordingly, isolates AM1 to AM5 are from the genus *Rhizobium* and isolate AM6 may be from another genus, and for the purpose of identifying the genus of these bacteria, they were partially detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) using It was found that it is 95% similar to the global isolate *Serratia surfactantfacien* YD25, registered in the gene bank with

the number PV030017, and it is worth noting that this bacterium was previously isolated globally according to the information available in the gene bank from two studies conducted in China, and this is the third time it was isolated for the first time at the local level.

The second axis :

Included tests related to the indirect mechanisms by which bacteria isolated from the root nodes of leguminous plants, so this study focused on the use of bacteria isolated from the root nodes of leguminous plants as biocontrol agents under laboratory conditions against three different types of plant-pathogenic bacteria (AM1, AM2, AM3, AM4, AM5, and AM6), namely *Agrobacterium tumefaciens* , *Xanthomonas campestris*, and *Lelliottia amnigena*. The first and second isolates were diagnosed by pathogenicity test and found to be capable of causing grown gall disease on carrot discs and Leaf blight disease on cabbage leaves, respectively.The first isolate was molecularly diagnosed and showed 99% identity with the global isolate *A. tumefaciens* N5B(2) with accession number OK355397.1, and was registered as a new isolate in the *A. tumefaciens* MN3 genebank with sequence PV842272.1. The third isolate was diagnosed as causing Soft Mold Disease on both potato tubers and mashroom fruits, as well as its molecular characterization in this study and was found to be 95% identical to the global isolate *L. amnigena* BW102, registered as PQ803913.1 in the gene bank, so it was registered as a new isolate in the gene bank as *L. amnigena* MN2 and sequenced as PV030017.

This axis was accomplished in two directions. The first direction was to study the inhibitory effect of these bacteria isolated from the root nodes on the growth of plant pathogenic bacteria based on the Antagonistic Activity Test (AAT) performed by the Cross-Streak Method, and isolate MA2 showed the strongest inhibitory effect on all types of pathogenic bacteria, followed by isolate MA5. In contrast, the remaining isolates (MA1, MA3, MA4, and MA6) only affected the growth of *X. campestris* and *L. amnigena* MN2, and *A. tumefacien* MN3 resisted the inhibitory effect of MA1 and MA6. The second direction was to study the effect of the Cell-Free Supernatent (CFS) on the growth of plant pathogenic bacteria by the Agar well Diffusion Method, and the

results showed that the sensitivity of these bacteria to CFSs was variable and reached the following percentages: 67, 34 and 17% for *A. tumefacien* MN3, *X. campestris* and *L. amnigena* MN2, respectively.

CFS isolate MA6, being the best of the five remaining filters in its effect on the three types of pathogenic bacteria, was selected for analysis and identification of its active substance contents by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and was found to contain four active compounds with the following chemical formulas: $C_7H_{13}NO_2$, $C_{11}H_{18}N_2O_2$, $C_{28}H_{53}NO_3$, and $C_{21}H_{39}NO_3$, with the following molecular weights: 143, 210, 451, and 353, respectively. We did not find a study showing the presence of these compounds in the cell-free supernatant of bacterial cells isolated from root nodules, so this is the first study in which the active substances were identified as extracellular secondary metabolites.

These results contribute to recommending the use of these isolates, as well as emphasizing the use of *S. surfactantfacien*, to promote plant growth as an environmentally friendly biofertilizer and in the management of plant pathogens to sustainably improve agricultural production.

University of Mosul
College of Education
For Pure Science

Investigation of plant growth-promoting mechanisms by some soil-inhabiting bacterial isolates

Marwa Asaad Nayef Ali Al-Sabaawee

M.Sc. Thesis
Biology

Supervised by

Professor
Dr.Najwa Ibrahim Khaleel Al-Barhawee

2025 A.D   1447 A.H