جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

عزل وتوصيف حامض الاندول-3-أسيتيك أسيد(IAA) المنتج من *Agrobacterium tumefaciens* المعزولة من الأورام التاجية لنبات السفرجل ودراسة تاثيره المحفز لنمو بادرات الطماطة

عبدالقادر سعد خضير احمد العكيدي

رسالة ماجستير

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة رغد نواف جرجيس الزيدي

1446هـ

2025م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحآلية محأور عدة ، كان المحور الأول مختصاً بعزل خمس وعشرين عزلة بكتيرية من مجموع أربعون عينه من الأورام التاجية المتكونة على سيقان أشجار السفرجل *Cydonia oblonga* العائدة لمواقع مختلفة من مدينة الموصل، وشملت مناطق (الرشيدية و يارمجة و حي المزارع و قرية الشمسيات و قرية الكصر وقرية قبرالعبد)، وشخصت العزلات اعتمادا على الصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية والإمراضية، انتخبت (11) عزلة بكتيريا، منها كانت سالبة لصبغة كرام ، وأفرزت النتائج الأولية من خلال النمو على الأوساط الانتخابية الخاصة بتشخيصها خمس عزلات أعطت مؤشرات إيجابية في التشخيص وأعطي لها الرموز AtCo1 وAtCo2وAtCo3 وAtCo4و AtCo5 *Agrobacterium tumefaciens* نسبةً إلى النبات المضيف الذي تم عزل البكتيريا منه ، وهو نبات السفرجل, كما أظهرت نتائج العدوى الإصطناعية لإختبار القدرة الإمراضية للعزلات البكتيريا نتيجة إيجابية للعزلات الخمس في تكوين الأورام على أقراص الجزر, وقد أكدت نتائج عزل وتوصيف محتوى الـDNA البلازميدي بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز للعزلات قيد الدراسة، امتلاك العزلات البكتيريا المعزولة على بلازميد واحد Tumor-inducing plasmid (Ti-plasmid) بشكل حزم منفصلة قريبة من حفر الهلام في جميع أعمدة نمإذج الـ DNA البلازميدي، وعززت هذه النتائج بنتائج التشخيص الجزيئي بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز للحامض النووي المعزول من عزلات *A.tumefaciens* ، وجاءت نتائج التشخيص الجزيئي بتضخيم الحمض النووي DNA باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي السلسلة Polymerase chain reaction of DNA (PCR) وباستخدام باديء الجين 16SrRNA ، حيث لوحظ انفصال حزم منفردة متألقة ذات دقة واضحة عند الحجم الجزيئي (bp1150) في العزلات الخمس لتؤكد عائدتيها إلى جنس Agrobacterium وتم تسجيل العزلة(AtCo2) المعزولة من أورام نبات السفرجل في بنك الجينات بالأسم العلمي *A.tumefaciens* وبـ ACCESSION PQ106659 ومن خلال بناء شجرة التقارب الوراثي للعزلة المشخصة مع عزلات مرجعية تابعة للجنس والنوع نفسه تبين أنها تقع ضمن العنقود نفسهِ وبنسبة تطابق (98) % وفق برنامج DNA Blast.

المحور الثاني من هذه الدراسة بنما اهتم بكشف عن هرمون إندول حامض الخليك IAA من العزلات البكتيرية، وتم انتخاب خمس عزلات من*A.tumefaciens* انفة الذكر وهي

بوصفها أفضل العزلات إنتاجاً لهرمون إندول حامض الخليك Indol -3-Acetic Acid IAA ، وقد أظهرت النتائج أن أفضل عزلة من بين تلك العزلات الخمس كانت *A.tumefaciens* (AtCo2) حيث أعطت أفضل إنتاج من الـIAA على وسط Luria-Bertani Medium مع التربتوفان (0.1%) بلغ 115 ميكروغرام/ مل بعد أربعة أيام من التحضين . المحور الثالث شمل تنقية وتوصيف هرمون الـ IAA المعزول من البكتيريا، إذ تم توصيفه باستخدام تقنية الـ TLCحيث أظهرت النتائج ان البقعة الناتجة من عينة الهرمون الخام المعزول بخلات الأثيل كانت أقرب ما يكون أو مطابقة لبقعة الهرمون IAA القياسي إذ بلغت قيمة معدل الجريان Rite of flow (Rf) لعينة الهرمون الخام (0.868)، اما التشخيص بتقنية الـHPL ، فقد كان زمن احتجاز هرمون الـ IAA المعزول من العزلةAtCo2 هو(2.802)دقيقة وهي مقاربة لزمن احتجاز هرمون الـ IAA القياسي (2.842) دقيقة، وتضمن المحور الرابع دراسة بعض الظروف واثرها على إنتاج الـIAA، حيث لوحظ أن إنتاج الهرمون من قبل عزلات بكتيريا *A.tumefaciens* يتأثر بشكل واضح بتغير الظروف المحيطة، خاصة نوع الوسط حيث سجلت أعلى إنتاجية للـ IAA والبالغة (158) مايكروغرام/مل عند استخدام الوسط Luria-bertani mediu تحت ظروف الوسط القياسية، وسجلت أعلى إنتاجية للـ IAA في العزلة (AtCo2)، عند دراسة افضل تركيز وهو(0.4%) من التربتوفان إذ بلغ إنتاجها (170.6) مايكروغرام/مل، وأعلى إنتاجية للـ IAA كانت قد سجلت باستخدام افضل مصدركاربوني هو الكلوكوز وكانت (109) مايكروغرام/مل وأن أفضل إنتاجية للـ IAA كانت (144.3) مايكروغرام/مل بعد افضل فترة تحضين وهي (4) أيام، وأظهرت النتائج أن للرقم الهيدروجيني pH تأثير كبير في إنتاج الـ IAA في العزلة (*A. tumefaciens*(AtCo2 حيث ظهر أعلى تركيز لإنتاج الـ IAA للعزلة (AtCo2) كان عند قيمة (pH7) وبلغت (171) مايكروغرام/ مل بينما كان تركيز انتاج الـ IAA في الظروف المثلى مجتمعة معاً هو (189) مايكروغرام/ مل. وتناول المحور الخامس تقييم الفعآلية البايولوجية للIAA المعزول وباستخدام هرمون الـ IAA القياسي بوصفه عينه، وشمل هذا المحور جانبين اهتم الجانب الأول بتأثير تنمية البكتيريا في الوسط المدعوم بتراكيز مختلفة من الـ IAA للكشف عن تحفيز الهرمون لقابلية البكتيريا على تكوين الأورام، إذ أظهرت نتائج العدوى الاصطناعية لـ *A. tumefaciens* باستخدام IAA عند إجراء الحقن المباشر للقاح البكتيري على أقراص الجزر، قدرة البكتيريا بوضوح قدرتها على تكوين الأورام، حيث ظهرت

الأورام على شكل نتوءات وبألوان متفاوتة بين الأخضر والأبيض وبتراكيب وأحجام مختلفة، وأظهرت البكتيريا المزروعة في الوسط المدعوم بـ (50) ميكروكرام / مل من الـ IAA أعلى قدرة على تكوين الأورام، حيث وصلت إلى 70% بمعدل زيادة 45.8%، وبأقل فترة زمنية وهي (21) يوماً وأعلى معدل للوزن الطري للأورام، بلغ (13.3) ملغم، عند معاملتها بالتركيز نفسه وبمعدل زيادة 70.6% مقارنة بمعاملة السيطرة الموجبة، بينما اهتم الجانب الثاني مقارنة سلوك الهرمون المنتج من قبل العزلة (AtCo2) *A.tumefaciens* مع هرمون الإندول القياسي وذلك بإجراء الإختبار البايولوجي على بذور الطماطم، وقد كان سلوك راشح البكتيريا مماثلاً لهرمون الـ IAA القياسي في معدل إنبات البذور، سجل أعلى معدل للانبات عند استخدام المعاملتين (2.5، 5.0) مل، وأظهرت النتائج أن المعاملة التي أستعمل فيها (2.5) مل من راشح البكتيريا سجلت أعلى معدل إنبات حيث بلغ (98%)، وهي تعادل تقريباً معاملة السيطرة السالبة التي أستعمل فيها الماءالمقطر، فضلاً عن كثافة واضحة في نمو الجذور مع اختلاف بسيط في مظهر البادرات النامية، وانعكس ذلك على المحتوى الكلوروفيلي، إذ سجلت أعلى نسبة من الكلوروفيل (a) (2.159%) والكلوروفيل (b) (1.548%)، عند المعاملة (2.5)مل للراشح البكتيري بالمقارنة مع الـ IAA القياسي والذي بلغت فيه نسبة الكلوروفيل (a) (2.075%) والكلوروفيل (b) (1.472%) عند المعاملة بالتركيز نفسه.

Abstract

The current study involved several axes, the first was concerned with isolating twenty-five bacterial isolates of the crown gall that were formed on the stems of *Cydonia oblonga* in various locations in Mosul. These locations included the neighborhoods of Rashideyyah, Yaremjah, ALShamseyyat village, AlGasr village and Gabr AlAbed village. The isolates were identified depending on the morpHological, culture characteristics and biochemical and epidemical tests. Eleven (11) bacterial isolates were selected, some of which were gram negative and the preliminary were sorted through the growth on the media by diagnosing five isolates that showed positive indicators in the diagnosis and the symbols (AtCo1,AtCo2, AtCo3,AtCo4 and AtCo5) *A tumefaciens* were assigned to them in accordance with the host plant from which the bacteria was isolated which is quince plant. Additionally, the results if artificial infection of the epidemical ability of the bacterial isolates showed a positive result for the five isolates in terms of forming tumors on the root discs. Also, the results of the isolation and the description of the plasmid DNA content by means of the electrical relay on the agarose for the isolates in question, showed that the bacterial isolates *Agrobacterium tumefaciens* (AtCo1, AtCo2, AtCo3, AtCo4, AtCo5) has one plasmid Tumor-inducing plasmid (Ti-plasmid) in the shape of separate bands that are close to the jelly wells in all the columns of the plasmid DNA. These results were supported by the results of the molecular diagnosis with the electrical relay on the agarose of the nucleic acid isolated from *A. tumefaciens* isolates. Moreover, the results of the molecular diagnosis using the DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and using the primer of 16SrRNA gene that showed separation of single sparkling bands with high resolution at the molecular size (1150 bp) in the five isolates and this confirms that that belong to the Agrobacterium species. The isolate (AtCo2) that was isolated from the tumors of *Cydonia oblonga* was registered in the gene bank with the scientific name *A.tumefaciens* and with ACCESSION PQ106659. Through constructing the genetic approach tree of the identified isolate with other isolates that belong to the same genre and species, it was clear that is located at the same cluster and with a correspondence percentage of (98%) according to the DNA Blast package. The second axis of the study was concerned with isolating and describing Indole Acetic Acid hormone IAA from the same aforemen-

tioned isolates from *Agrobacterium tumefaciens*.These isolates are: AtCo1, AtCo2, AtCo3, AtCo4 and AtCo5 as the best isolates that produce the IAA hormone. Results showed that the best amongst the five isolates was *Agrobacterium tumefaciens* (AtCo2) as it gave the best results of producing Indole Acetic Acid hormone as the percentage was (0.1%) 115 microgram/ml on Luria-Bertani Medium with tryptopHan after four days of incubation. The third axis involved the purification and description of the isolated IAA from bacteria as it was described using the TLC technique and results showed that the spot resulting from the raw hormone sample that was isolated with ethyl acetate was most identical to the spot of the standard IAA hormone as the rate of flow (Rf) of the sample of the raw hormone was (0.868) with HPLC technology and retention time of the IAA hormone that was isolated from the sample AtCo2 was (2.802) which is close to the retention time of standard IAA that was (2.842). The fourth axis: It was observed that the production of the hormone by the bacteria *Agrobacterium tumefaciens* is evidently affected with the change of surrounding conditions, particularly the type of medium as the highest production of IAA (158 microgram/ml) was recorded when Luria-bertani medium was used and with pH and the concentration of the tryptopHan that was added to the medium as well as the addition of various carbon and nitrogen sources to the medium and the different periods of incubation. The highest production of IAA (170.6 microgram/ml) was recorded for AtCo2) bacteria at the concentration of (0.4%) of tryptopHan and the highest production of IAA (109 microgram/ml) was when using various carbon sources when glucose was used. On the other hand, the best production of IAA was (144.3 microgram/ml) after four days of incubation and the production began to decrease after the fourth day. The results showed that pH had a significant effect on producing IAA in A. tumefaciens AtCo20 bacteria as the highest production of IAA for the bacterial isolate (AltCo2) was at the value (7) of pH and it was (171 microgram/ml). The Fifth axis: It dealt with evaluating the biological effectiveness of IAA isolated using the standard IAA as the sample of the fifth axis. It tackled evaluating the biological effectiveness of IAA isolated using the standard IAA as a control sample. It dealt with two aspects; the first is the affect of bacteria growth in the medium supported with different concentrations of IAA to find out the stimulation of the hormone to the ability of the bacteria to form tumors, as the results of artificial infec-

tion of *A. tumefaciens* showed that when conducting the direct infection of the bacterial vaccination in the carrot discs, the bacteria evidently showed it ability to form tumors and these tumors appeared as various-color swellings ranging between the green and white with different structures and sizes. In the culture supported with (50 microgram/ml) of IAA, the bacteria showed the highest ability to form the tumors as the percentage reached to (70%), with a rate of increase of (45.8%) with the shortest time period (21 days) and also showed the highest average of fresh weight (13.3 mg) when treated with the same concentration with an increase average of (70.6%) compared to the positive control treatment. On the other hand, the study dealt with comparing the behavior of the hormone produced from the isolate *Agrobacterium tumefaciens* (AtCo2) with the standard indole and that was through the biological test of the tomato seeds. The behavior of the bacteria filtrate was similar to the standard IAA behavior in terms of the seed germination rate and the highest germination rates recorded when using the two treatments were (2.5 and 5.0 ml). moreover, results showed that the treatment in which (2.5 ml) of the bacterial filtrate was used recorded the highest germination rate (98%), which is the same value of the positive control treatment in which the water was used in addition to a clear density of the root growth and a slight difference in the shape of the growing primer.This was reflected in the chloropHyll content, with the highest ratio of chloropHyll (a) (2.159) and chloropHyll (b) (1.548) recorded at treatment (2.5) of the bacterial filtrate compared to the standard IAA, in which the ratio of chloropHyll (a) (2.075) and chloropHyll (1.472) (b) at the same concentration.

University of Mosul
College of Education
For Pure Science

Isolation and Charaterization of Indole-3-Acetic Acid IAA produced by *Agrobacterium tumefaciens* isolated from Quince plant Crown Gall and Investigation of its Growth Promoting Effects on tomato

Abdulqader Saad Khudair Ahmed Al Akidi

M.Sc. Thesis
Biology

Supervised by

Assist. Prof
Dr. Raghad Nawaf Gerges Al-Zaidi

2025 A.D **1446 A.H**