تقييم قدرة عزلات محلية من بكتريا المحيط الجذري rhizobacteria للحمّص في إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي Indole-3 acetic acid (IAA)

منال الدّوس[1] وعايدة جلّول[2] ومحمود أبو غرّة[2]
وفواز العظمة[2] ويوسف العمّوري[3]

الملخّص

جمعت عينات من نباتات الحمص *Cicer arietinum* من ست محافظات في الجمهورية العربية السورية (ريف دمشق، درعا، حماة، طرطوس، السويداء، القنيطرة) لعزل الـ Rhizobacteria من العقد الجذرية. تم الحصول على 19 عزلة بكتيرية عُرفت بالاعتماد على الصفات المورفولوجية وبعض الخصائص الكيميائية الحيوية التي أظهرت أن 15 عزلة بكتيرية يمكن أن تتبع الجنس *Rhizobium*. دُرِسَت قدرة العزلات على إنتاج حمض الإندول الخلي IAA بغياب الـ L-tryptophan (1مغ/مل) ووجوده. أبدت جميع العزلات قدرة على إنتاجه وبتراكيز مختلفة مع الزمن بوجود الـ L-tryptophan فقط، وتميزت العزلات R5، R9، R14 بإنتاج عالٍ من IAA مقارنة مع باقي العزلات. لذلك استخدمت العزلات ذات الإنتاجية العالية لتحديد التراكيز المثلى من الـ L-tryptophan التي تعطي أعلى إنتاج من IAA مع الزمن.بعد 72 ساعة من التلقيح، أعطت العزلتان R5 وR14 أعلى تركيز من (IAA42 و104ميكروغرام/مل)، على التوالي بوجود 3 مغ تربتوفان/مل في وسطY، بينما أعطت العزلة R9 أعلى تركيز من IAA71 ميكروغرام/مل بوجود 2.5 مع تربتوفان/مل في وسط YM.

الكلمات المفتاحية: نبات الحمّص، بكتريا المحيط الجذري، حمض الاندول الخلّي.

[1] طالبة ماجستير، [2] قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق
[3] الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية.

Evaluation the ability of local isolates of rhizobacteria from Chikpea for the production of the hormone indole-3 acetic acid (IAA)

Manal Aldous[(1)], Aida Galol [(2)], M. Abo Gourah [(2)], F. Azmeh [(2)], and Y. Amouri[(3)]

Abstract

Samples of chickpea plants (*cicer arietinum*) were collected from six governerates (Damascus countryside, Dara'a, Hama, Tartous, Sweida, and Quneitra) in Syria. The rhizobacteria were isolated from nodes of these plants, and identified using morphological and some biochemical characters. Results showed that 15 isolates may belong to genus *Rhizobium*. These isolates were evaluated for their ability to produce Indol Acetic Acid (IAA) in the absence and the presence of L-tryptophan (1mg/ml). Results showed that all isolates can produce IAA in different concentrations in presence of L-tryptphan only; where the isolates R5, R9, R14 produced a high concentration. These isolates were used to determine the optimal conditions of L-tryptophan concentration and incubation time necessary for the optimum IAA production. The results also showed at 72h post incubation that the isolates R5,R14 were able to produce the highest level of IAA (42, 104µg/ml) respectively, in presence of 3 mg L-Tryptophan/ml YM medium) while the isolate R9 produced the highest level of IAA 71µg/ml in presence of 2.5mg L-Tryptophan/ml YM medium.

Kaywords: IAA, Rhizobacteria, *Cicer arietinum*

[(1)] MS. Student , [(2)] Plant Prot. Fac. Agric. Damascus Univ. Syria.
[(3)] National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria.

المقدمة

في عام 1880 اقترح شارلز داروين أن تنظيم نمو وردود فعل النبات ناتج عن "أمر" ينتقل أثره من جزء مُصنَع إلى جزء آخر مُستجيب. وبعد عدة عقود من الزمن عُرِّف هذا "الأمر" بأنه أوكسين تم تسميته بحمض الإندول الخلّي Indole-3- acetic acid (Alikhani وزملاؤه، 2010).

يعد حمض الإندول الخلي أحد أهم الهرمونات النباتية وأكثرها نشاطاً من الناحية الفيزيولوجية حيث يتحكم في نمو الخلايا، والانقسام الخلوي، وتمايز الأنسجة، واستجابة النبات للضوء والجّاذبية، ونمو وتطور الأعضاء النباتية (Shahab وزملاؤه، 2009).

يحرر المجموع الجذري في أثناء نموه في التربة العديد من المركبات القابلة للذوبان كالأحماض الأمينية والسكريات والأحماض العضوية فتستفيد منها الكائنات الحية الدقيقة المحيطة بالجذر، والتي بدورها تجعل العناصر الغذائية الأخرى متاحة للنبات كما تنتج العديد من المواد كالمضادات الحيوية والفيتامينات وجزيئات الاتصال والهرمونات النباتية، وتشجع كل هذه المواد نمو النبات (Sahasrabudhe، 2011)، وهكذا يحدث التفاعل التكافلي بين هذه الكائنات الدقيقة والنبات. تنتج مختلف الكائنات الحية الدقيقة في التربة من بكتريا (Muller وزملاؤه، 1989)، وفطور (Stein وزملاؤه، 1985)، وطحالب (Finnie و Van Staden، 1985) كميات نشطة فيزيولوجياً من الأوكسينات (Shahab وزملاؤه، 2009).

كما تفرز بكتريا المحيط الجذري المحفزة لنمو النبات Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) العديد من المستقلبات الثانوية مثل: السيديروفور، HCN، والهرمونات النباتية (Sridevi و Mallaiah، 2008). ولوحظ أن 80% من البكتريا المعزولة من المحيط الجذري كانت قادرة على إنتاج حمض الإندول الخلي IAA (Sahasrabudhe، 2011)، ومن هنا تأتي قدرة هذه البكتريا (PGPR) على تحفيز نمو النبات وتحريضه (Reetha وزملاؤه، 2014).

يتشكل هذا الهرمون نتيجة لاستقلاب الحمض الأميني تربتوفان L-tryptophan من قِبَل العديد من الكائنات الدقيقة بما فيها الـ *Rhizobium* (Datta و Basu، 2000؛ Patten وGlick، 2002)، ويختلف تركيز الهرمون المنتج بواسطة بكتريا المحيط الجذري كالرايزوبيوم حسب تركيز التربتوفان في الوسط و حسب الزمن بدءاً من التلقيح (Sridevi و Mallaiah، 2008). وقد لوحظ أن كل عزلات الرايزوبيوم المعزولة من ترب عدة مناطق إيرانية قادرة على إنتاج IAA مع اختلاف الكمية المنتجة حسب النوع البكتيري وحسب السلالات ضمن النوع الواحد (Alikhani وزملاؤه، 2010) وحسب الارتفاع عن سطح البحر (Etesami وزملاؤه، 2008). وقد وجد Sridevi و Mallaiah (2008) أن

عزلات الرايزوبيوم المعزولة من جذور *Sesbania procumbens* والعقد الساقية لنبات *S. rostrata* تفرز أعلى تركيز من حمض الإندول الخلي بعد 72 ساعة من الزرع على وسط يحوي 3 مغ/مل من L-tryptophan.

اختبر Joseph وزملاؤه (2007) قدرة 150 عزلة من بكتريا المحيط الجذري المحفزة لنمو النبات PGPR (*Bacillus*، *Pseudomonas*، *Azotobacter*، *Rhizobium*) على إنتاج هرمون IAA فوجدوا أن جميع العزلات التابعة للأجناس *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Azotobacter* كانت قادرة على إنتاج هرمون IAA بينما استطاع 85,7% فقط من الجنس *Rhizobium* إنتاج هذا الهرمون.

بيّن Etesami وزملاؤه (2008) أن استخدام عزلات من بكتريا الرايزوبيوم *Rhizobiumleguminosarum var. phaseoli* و *Rhizobiumleguminosarum var. viciae* في تلقيح القمح أدى إلى زيادة معنوية في مؤشرات النمو (طول الجذر، طول الساق، الوزن الجاف للجذر، الوزن الجاف للساق) بالمقارنة مع الشاهد بسبب إنتاجها لهرمون IAA، ولذلك قد تكون هذه البكتريا مفيدة ليس فقط للنبات العائل و إنما للنباتات الأخرى أيضاً (Alikhani وزملاؤه، 2010).

كما أشار Erum و Bano (2008) إلى حدوث زيادة في الوزن الرطب والجاف والعدد الأعظمي للعقد عند تلقيح فول الصويا المزروع في تربة معقمة بلقاح من الرايزوبيوم معزولة من المناطق الشمالية لباكستان وهذه الزيادة تعزى إلى الكمية الإضافية من هرمون IAA التي تمد البكتريا بها النبات.

بينما لوحظ أنّ تلقيح الحمص بعزلات من *Rhizobium leguminosarum bv. Ciceri* معزولة من جذور الحمص البري أظهر زيادة في الوزن الجاف للنبات، والعقد، والنسبة المئوية للآزوت واليخضور، وإنتاجية النبات من البذور، والكتلة الحيوية وزيادة كفاءة تثبيت الآزوت تكافلياً بالمقارنة مع الشاهد غير الملقح (Kantar وزملاؤه، 2003).

واستطاعت العزلة MRC4 من الجنس البكتيري *Mesorhizobium* المعزولة من جذور الحمص إنتاج كمية جيدة من حمض الإندول الخلي3 ميكروغرام/مل (Ahemad و Kan، 2010)، والسيديروفور، وسيانيد الهيدروجين، والأمونيا (Ahemad و Kan، 2009).

وعندما درس Mirza وزملاؤه (2007) تأثير عزلات من *Rhizobium* و *Enterobacter* المعزولة من جذور والعقد الجذرية لنبات الحمص وجد أن جميع العزلات منتجة لهرمون IAA والجبرلين.

ولاحظ Obaton وزملاؤه (1996) قدرة عزلات سورية ومغربية وتركية من *Rhizobium meliloti* (M53 و M29 و M375 و M527) على التفاعل مع نبات الفصة وحدوث التعقد وبدء تثبيت الآزوت في مرحلة مبكرة من موسم النمو عند درجات حرارة

منخفضة على عكس الأسمدة الآزوتية، كما أدى التلقيح بعزلات من *Rhizobium* إلى زيادة عدد العقد وحجمها على جذور الحمص الشتوي أكثر مما هي عليه في الحمص الربيعي (Islam، 1981).

ومن هنا تأتي أهمية بكتريا المحيط الجذري التي تساعد على التقليل من استخدام الأسمدة الكيميائية كونها تنتج الهرمونات النباتية وبالتالي تحفز نمو العائل النباتي وتزيد مقاومته للإجهادات، وتحسن من الحالة الغذائية له من خلال تحسين نمو الجذر وامتصاصه للعناصر الغذائية من التربة (Sridevi وMallaiah، 2007).

يهدف هذا البحث لاختبار كفاءة عزلات محلية من بكتريا المحيط الجذري للحمص في إنتاج هرمون حمض الإندول الخلي وتحديد تركيز الـ L-tryptophan والزمن الذي تنتج البكتريا عندهما أعلى تركيز من الهرمون.

مواد البحث وطرائقه

1- العينات النباتية ومكان الجّمع:

تم جمع عينات نبات الحمص في شهر نيسان لعام 2014 من مناطق متعددة من بعض محافظات الجمهورية العربية السورية: ريف دمشق، ودرعا، والسويداء، وحماة، والقنيطرة، وطرطوس (الجدول1).

وتم إجراء البحث في مخبر الأمراض البكتيرية في كلية الزراعة ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

2- عزل وتوصيف البكتريا:

عزلت البكتريا من العقد الجذرية لنبات الحمص بعد تعقيمه بهيبوكلوريت الصوديوم 1,5%، ثم الكحول70% والغسل ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم ، طحنت العقد ضمن ماء مقطر ومعقم ثم تم النشر على وسط مستخلص الخميرة والمانيتول آغار YMA Yeast manitol agar (مانيتول1%، آغار1,5%، خميرة0,1%، $0,08K_2HPO_4$%، $0,02KH_2PO_4$%، 0.01Nacl%، $0.02Mgso_4.7H_2O$%) والتحضين لمدة 48ساعة عند درجة حرارة 28مْ (الدرجة المثلى لنمو البكتريا).

نقلت المستعمرات النقية إلى وسط جديد من YMA يحتوي على أحمر الكونغو1% للتنقية، ومن ثم حُفظت ضمن محلول YMA/Glycerol (7:3) (V:V). لإجراء توصيف أوّلي للبكتريا تم إجراء عدد من الاختبارات المورفولوجية (اختبار غرام، شكل المستعمرة، لونها، حوافها)، وعدد من الاختبارات الكيميائية الحيوية (oxidase, catalase، استقلاب الغلوكوز GPA، استقلاب اللاكتوز LPA، تحلل الجيلاتين، تحلل النشاء).

3- **تحديد تركيز حمض الإندول الخلي IAA** :

تم تحضير معلق بكتيري بتركيز 3×10^8خلية بكتيرية/مل (OD_{600}=0.3) واستخدم 100ميكرولتر من هذا المعلق في تلقيح أنابيب تحتوي 5 مل من وسط مغذي YM يحتوي على تراكيز مختلفة من L-tryptophan (0.5، 1.5، 2، 2.5، 3 مغ/مل)، وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عزلة.

بعد التلقيح حضنت الأنابيب عند درجة حرارة 28 مْ مع الرّج بسرعة 100 دورة/دقيقة خلال فترة زمنية تراوحت 5-0 أيام من تاريخ التلقيح.

تم الكشف عن قدرة العزلات المدروسة على إنتاج الـ IAA حسب طريقة سالكوسكي (holt وزملاؤه، 1994) مع تعديلات طفيفة باستخدام المشعر (Perchloric acid 70% مضافاً له $Fecl_3$ 0.5M)، حيث أخذ المعلق البكتيري وتم التخلص من البكتريا بالتثفيل على 10000 g لمدة خمس دقائق لمرتين متتاليتين عند درجة حرارة 4 مْ، أخذ 1مل من الطافي وأضيف له 2مل من المشعر وحضّن لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة وأوقف التفاعل بإضافة 3 نقاط من حمض الفوسفور.

يؤدي وجود IAA في التفاعل إلى تغير لون المشعر الأصفر إلى اللون الأحمر القرمزي وتم قياس الشدة اللونية بأخذ الامتصاصية بوساطة جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 535nm، وحددّ التركيز الكلّي لحمض الإندول الخلّي بالمقارنة مع محلول قياسي من الـIAA التجاري (Schendel-e/L620253 306) المحضر بعدة تراكيز (0، 3.125, 6.25, 12.5, 25، 50، 100 ميكروغرام/مل) ضمن وسط YM السائل، حيث ساعد المحلول القياسي في الحصول على معادلة خط مستقيم.

النتـــائـــج

1- عزل البكتريا وتوصيفها:

تم الحصول على 19 عزلة بكتيرية من بكتريا المحيط الجذري (الجدول1) حيث ظهرت بعد 48 ساعة من النمو على وسط YMA على شكل مستعمرات كريمية، ومخاطية، وتامة الحواف، وحافظت على لونها الكريمي دون أن تتشرب باللون الأحمر عند الزرع على الوسط الانتخابي YMA مع أحمر الكونغو.

الجدول (1) أماكن جمع العينات النباتية وأسماء العزلات البكتيرية المعزولة منها.

اسم العزلة	منطقة الجمع	رمز العزلة	منطقة الجمع	رمز العزلة	منطقة الجمع	رمز العزلة	منطقة الجمع
R1	ازرع	R6	بريقة	R11	طيبة الإمام	R16	عدرا
R2	وادي القرن	R7	بريقة	R12	خان الشيح	R17	ناحتة
R3	القدموس	R8	جيرود	R13	المليحة	R18	القلمون
R4	أبوجرش	R9	الكوم	R14	صلخد	R19	الغاب
R5	النبك	R10	الكسوة	R15	صلخد		

يُظهر الجدول(2) أن جميع العزلات البكتيرية سالبة غرام، و قادرة على استقلاب سكر الغلوكوز بينما أعطت هذه العزلات نتيجة سلبية لاستقلاب اللاكتوز واختبار الأوكسيداز و تحلل الجيلاتين باستثناء العزلات R7 و R15 و R17 و R18 التي أعطت نتيجة إيجابية لهذه الاختبارات ونتيجة سلبية لاختبار تحلل النشاء على عكس باقي العزلات.

الجدول (2) نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلات البكتيرية.

اسم العزلة	الاختبارات الكيميائية الحيوية						
	استقلاب الغلوكوز	استقلاب اللاكتوز	اختبار الكاتالاز	اختبار الأوكسيداز	تحلل الجيلاتين	تحلل النشاء	اختبارغرام
R1	+	-	+	-	-	+	-
R2	+	-	+	-	-	+	-
R3	+	-	+	-	-	+	-
R4	+	-	+	-	-	+	-
R5	+	-	+	-	-	+	-
R6	+	-	+	-	-	+	-
R7	+	+	+	+	+	-	-
R8	+	-	+	-	-	+	-
R9	+	-	+	-	-	+	-
R10	+	-	+	-	-	+	-
R11	+	-	+	-	-	+	-
R12	+	-	+	-	-	+	-
R13	+	-	+	-	-	+	-
R14	+	-	+	-	-	+	-
R15	+	+	+	+	+	-	-
R16	+	-	+	-	-	+	-
R17	+	+	+	+	+	-	-
R18	+	+	+	+	+	-	-
R19	+	-	+	-	-	+	-

تشير هذه الاختبارات الأولية إلى أن 15 عزلة بكتيرية تنتمي إلى الجنس *Rhizobium* الذي يتميز بأنه: سالب غرام، وسالب الأوكسيداز، ويستخدم سكر الغلوكوز كمصدر للكربون، ويحلل النّشاء، بينما لايستطيع استقلاب سكر اللاكتوز ولا تحليل الجيلاتين.

2- تقييم قدرة عزلات الـ rhizobacteria في إنتاج الـIAA:

أجريت هذه الدراسة على جميع العزلات المذكورة في الجدول (1) بغياب ووجود الـL-tryptophan 0.1 مغ/مل.

بينت هذه الدراسة غياب أي إنتاج لـIAA بغياب الـL-tryptophan في الوسط وذلك بالنسبة لجميع العزلات المدروسة خلال الأيام الخمسة من الدراسة.

أما بوجود 0.1 مغ/مل من L-tryptophan في الوسط أظهرت النتائج المعروضة في (الجدول3) أن جميع العزلات المدروسة كانت قادرة على إنتاج الـIAA بتراكيز مختلفة تراوحت بين 0.35±0.03 ميكروغرام/مل للعزلة R19 وبين 9.62±2.86 ميكروغرام/مل للعزلة R16 بعد 24 ساعة من التلقيح. وازداد الإنتاج بعد 48 ساعة وتراوح بين 0.70±0.38 ميكروغرام/مل للعزلة R19 و13.25±4.93 ميكروغرام/مل للعزلة R16 .

واستمر التركيز بالارتفاع بعد 72ساعة ليتراوح بين 2.17±1.65 ميكروغرام/مل للعزلة R19 و37.31±0.07 ميكروغرام/مل للعزلة R9. كما بدأ تركيز الهرمون المنتج بالانخفاض بعد 96 ساعة ليتراوح بين 0.10±0.00 ميكروغرام/مل للعزلة R19 و18.41±3.21 ميكروغرام/مل للعزلة R5.

3- تأثير تركيز الـ L-tryptophan في إنتاج عزلات بكتريا الـ rhizobacteria للـIAA:

تم اختيار ثلاث عزلات R14 وR9 وR5 التي أعطت أعلى إنتاج من الـ IAA في اليوم الثالث بوجود 0,1 مغ/مل من L-tryptophan (الجدول3)، وتم تقييم قدرتها على إنتاج الـIAA في وسط YM يحوي على تراكيز مختلفة من L-tryptophan (0.5، 1.5، 2، 2.5، 3 مغ/مل)، ومع الزمن.

يبين الشكل(1و2) زيادة إنتاج الـIAA بواسطة العزلات الثلاث بشكل طردي مع زيادة تركيز L-tryptophan في وسط الزرع، باستثناء العزلة R9 حيث انخفض الإنتاج عند التركيز 3 مغ/مل من L-tryptophan، كما ازداد تركيز الـ IAA مع الزمن، حيث أعطت العزلة R5 أعلى تركيز من الـ IAA بعد 48 ساعة من التلقيح (2.85±13.45 ميكروغرام/مل)، بينما كان أعلى إنتاج من الـ IAA بالنسبة للعزلة R14 بعد 72 ساعة من التلقيح (7.70±70.04 ميكروغرام/مل) وذلك عند التركيز 3 مغ/مل من L-tryptophan في الوسط، أما العزلة R9 فقد أنتجت أعلى تركيز من الـ IAA

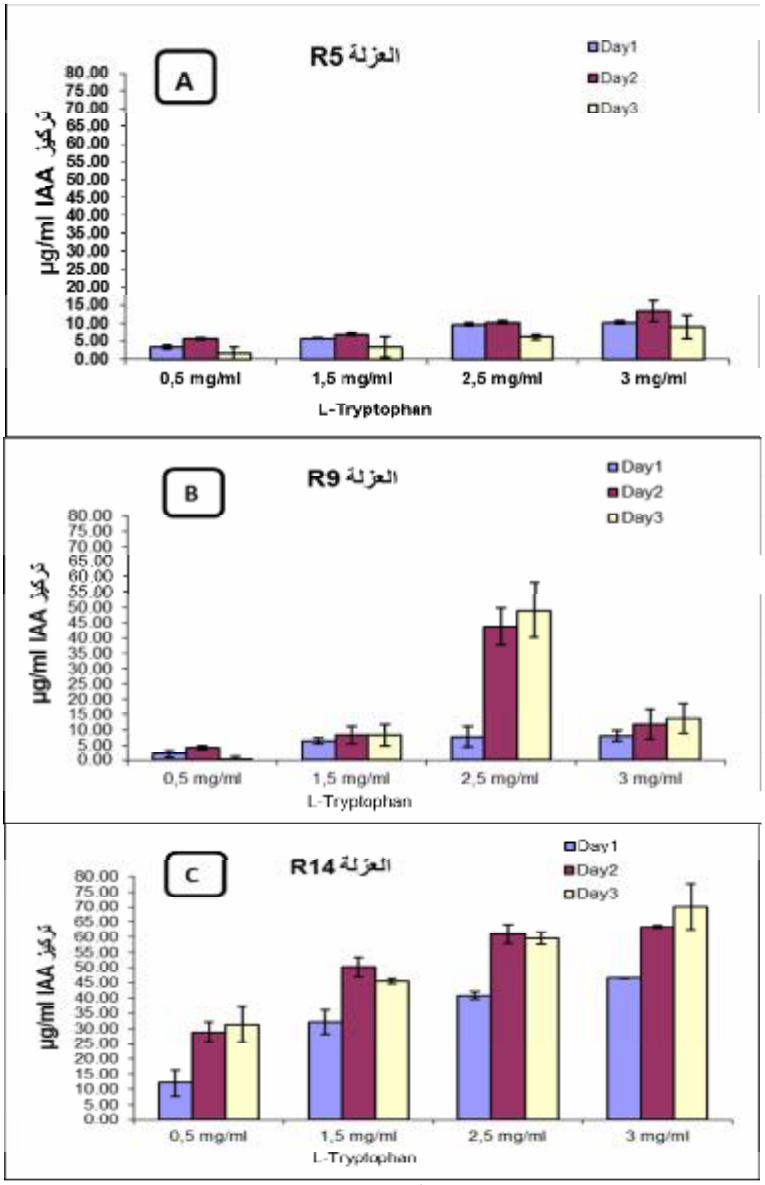
(49.01±8.85 ميكروغرام/مل) بعد 72 ساعة من التلقيح عند تركيز 2.5 مغ/مل من الـ L-tryptophan وكان التركيز الأعلى 3مغ/مل مثبطاً للإنتاج بالنسبة لهذه العزلة.

ويظهر الشكل(2) أن أكثر العزلات قدرة على إنتاج الـ IAA هي العزلة R14 وعند التركيز 3مغ/مل من الـ L-tryptophan.

الجدول(3) تركيز حمض الإندول الخلي المُنتَج بوساطة العزلات البكتيرية مع الزّمن*.

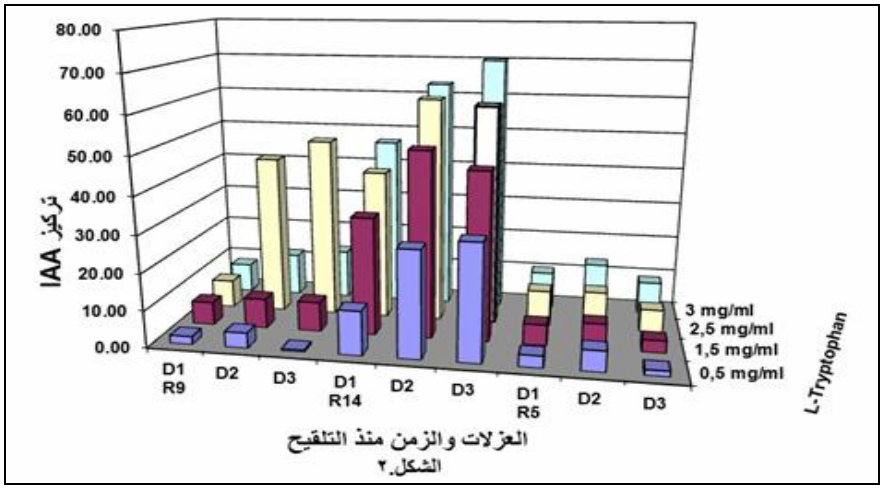
رمز العزلة	تركيز هرمون الـ IAA المنتج بواسطة عزلات Rhizobacteria ميكروغرام/مل			
	اليوم1	اليوم2	اليوم3	اليوم4
R1	0.37±1.75	0.53±2.56	0.55±3.34	1.08±1.67
R2	0.03±0.76	0.74±2.85	0.71±4.87	0.38±3.14
R3	0.15±0.85	0.31±1.15	1.14±3.59	0.00±0.10
R4	0.76±4.77	0.73±6.79	1.98±8.85	1.09±4.87
R5	0.76±5.88	4.13±10.58	1.21±26.47	3.21±18.41
R6	0.53±1.51	0.56±6.11	1.25±10.19	0.45±3.53
R7	0.41±3.07	0.24±6.31	1.03±8.31	0.22±1.05
R8	1.18±5.78	2.87±12.57	1.29±9.86	2.02±8.65
R9	0.62±1.49	0.88±7.99	0.07±37.31	0.82±7.45
R10	0.56±1.09	1.84±2.93	3.67±5.45	2.31±3.77
R11	0.78±4.72	0.19±6.35	2.18±8.75	1.13±7.14
R12	0.12±5.28	0.39±6.54	2.81±11.02	1.66±9.90
R13	0.63±3.82	0.48±4.68	3.16±10.25	2.61±11.43
R14	1.57±8.21	4.11±12.19	0.03±22.72	0.39±1.98
R15	0.27±4.35	0.80±5.71	5.38±10.01	1.11±2.76
R16	2.86±9.62	4.93±13.25	7.95±18.12	1.11±2.76
R17	0.44±0.72	0.67±1.49	0.17±3.73	0.17±0.25
R18	0.09±0.82	0.29±1.32	1.86±3.26	0.83±1.48
R19	0.03±0.35	0.38±0.70	1.65±2.17	0.00±0.10

* تمثّل القيم المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاثة مكررات تجريبية.



*: Aالعزلة R5؛ Bالعزلة R9؛ Cالعزلة R14 وتمثل الأعمدة المتوسط الحسابي±الانحراف المعياري لثلاثة مكررات تجريبية.

الشكل (1) تأثير تركيز L-tryptophan على الـIAA المنتج من العزلات R5 وR9 وR14 في الوسط مع الزمن.



عزلات rhizobacteria (R9 وR14 وR5) مع الزمن(متوسط ثلاثة مكررات تجريبية).

الشكل (2) شكل ثلاثي الأبعاد يظهر تأثير تركيز L-tryptophan على إنتاج الـــIAA بوساطة

المناقشة

تم الحصول خلال هذه الدراسة على 19عزلة من المحيط الجذري لنبـــات الحمـــص، منها 15 عزلة على الأقل قد تنتمي إلى الجنس *Rhizobium* وذلك استناداً إلى الاختبارات الكيميائية الحيوية والمورفولوجية وذلك حـــسب Deora وSinghal (2010)، والتعريـــف الدقيق لهذه العزلات يتطلب اختبارات إضافية متخصصة مثـــل الاختبـــارات الجزيئيـــة باستخدام بادئات متخصصة.

أظهرت نتائج هذه الدراسة قدرة جميع العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها مـــن العقد الجذرية لنبات الحمّص على إنتاج حمض الإندول الخلي IAA وهذا ينسجم مع مـــا أشارت إليه الدراسات عن قدرة بكتريا rhizobacteria على إنتـــاج IAA مثـــل بكتريـــا *Pseudomonas putida* (Patten وGlick، 2002)، وبكتريا *Bradyrhizobiumelkanii* (Minamisawa وزملاؤه، 1996)، وبكتريا *Azotobacter* و*Pseudomonas* و*Bacillus* و*Mesorhizobium* (Ahmad وزملاؤه، 2008).

لوحظ غياب أي إنتاج لـــ IAA بغياب L-tryptophan في وسط الزرع الذي نميـــت فيه البكتريا 2 وسط الزرع، وكذلك لعدم قدرة البكتريا على تصنيع L-tryptophan بينمـــا وجد Ahmad وزملاؤه(2005) أن بكتريا *Azotobacter sp.* أنتجت كميات منخفضة من الهرمون (2,68-10,80 مغ/مل) عند تنميتها في وسط لايحوي L-tryptophan.

يُظهر الجدول (1) اختلافاً في تركيز هرمون الـــ IAA المنتج تبعاً لاختلاف العزلـــة ومع الزمن بوجود L-tryptophan وهذا يتوافق مع ماتوصل إليه Tien وزملاؤه (1979) حيث ازداد إنتاج الهرمون مع ازدياد عمر البكتريا، وتم إنتاج أعلى تركيز بعد 72 ساعة من التلقيح بالنسبة لـــ18 عزلة بكتيرية بينما أعطت العزلة R8 أعلى تركيز بعد 48 ساعة من التلقيح.

بينما بيّن Ahmad وزملاؤه (2005) أن العزلات البكتيريـــة مـــن *Azotobacter sp.* أعطت أعلى مستوى من الهرمون (7.3-32.8 ميكروغرام/مل) في اليوم 15 من التلقـــيح في وسط الزرع (سكروز20غ، فوسفات ثنائية البوتاسيوم 1غ، سلفات المغنزيـــوم 0,5غ، كلور الصوديوم 0.5غ، سلفات الحديد 0,1غ، مولبيـــدات الـــصوديوم 0.005غ، آغـــار 20غ)، أما عزلات بكتريا *Pseudomonas sp.* أنتجت (في وســـط King B) مـــستويات عالية من الهرمون (41.0-53.2ميكروغرام/مل) في اليوم 7 من التلقيح، وقد يعود هـــذا الاختلاف إلى اختلاف النوع البكتيري أو تركيز اللقاح الأولي أو مكونات وسط الـــزرع، بينما وجد Seridevi وMallaiah (2007) أن بكتريا *Rhizobium* أنتجت أعلى مـــستوى من الهرمون بعد 72ساعة من التلقيح بتراكيز تراوحت بين (4-28) ميكروغـــرام/مـــل، وهذا يتوافق مع ما أظهرته هذه الدراسة.

كذلك أظهرت الدراسة وجود تأثير لتركيز L-tryptophan في الوســـط علـــى قـــدرة العزلات البكتيرية على إنتاج هرمون الـــIAA حيث ازداد تركيز الهرمون المنـــتج مـــع ازدياد تركيز L-tryptophan وهذا يتوافق مع Tien وزملائـــه (1979) حيـــث تركيـــز الهرمون المنتج مع ازدياد تركيـــز L-tryptophan فـــي وســـط الـــزرع مـــن 1-100 ميكروغرام/مل.

تباينت قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج الـــ IAA بـــين إنتـــاج مـــنخفض بالنـــسبة للعزلات R1 وR2 وR3 وR17 وR18 وR19 وبين إنتاج عال بالنسبة للعزلات R5 وR9 وR14 وهذا الاختلاف قد يعود إلى تباين وراثي في العزلات البكتيرية حسب ما أشار إليه Erum وBano (2008) حيث كان مصدر التباين الوراثي هو اختلاف المنطقة الجغرافية وارتفاعها عن سطح البحر، بينما لاحظ Sahasradbudhe (2011) تبايناً في عزلات الـــ *Rhizobium* حسب النبات الذي عزلت منه.

أنتجت العزلات R14 وR9 أعلى تركيز من الهرمون (49-70 ميكروغرام/مل على التوالي) بعد 72 ساعة من التلقيح وهذه النتيجة تتطابق مع ما توصل إليه Seridevi وMallaiah (2007) بينما أنتجت العزلة R5 أفضل تركيز من الهرمون (13ميكروغرام/مل) بعد 48 ساعة من التلقيح (الشكل2).

وضمن الشروط التجريبية المتبعة كان أفضل تركيز من L-tryptophan في الوسط 3 مغ/مل بالنسبة للعزلتين R5 وR14 و2.5 مغ/مل للعزلة R9 (الشكلA.C.1) وهذا يتفق مع ما ذكره Seridevi وMallaiah (2007).

قد يعود سبب انخفاض تركيز الهرمون في اليوم الرابع إلى تفككه كيميائياً أو حيوياً بواسطة أنزيمات تفرزها البكتريا (Yamakawa وزملاؤه، 1979؛ Raczkowska-Blach، 1995).

توجّه هذه النتائج إلى متابعة العمل لتعريف العزلات بشكل دقيق، واختيار العزلات الأكثر كفاءة في إنتاج الهرمون بهدف استخدامها لإنتاجه كمياً، وأمثلة شروط إنتاج الهرمون ومن ثم الحصول عليه بشكل نقي لاستخدامه في زراعة النسج كهرمون تجذير.

References

Ahemad, M. and M. S. Khan. 2010. Ameliorative effects of *Mesorhizobium sp.* MRC4 on chickpea yield and yield components under different doses of herbicide stress. Pesticide Biochemistry and Physiology. 98(2): 183–190.

Ahemad, M. and M. S. Khan. 2009. Effect of insecticide-tolerant and plant growth-promoting *Mesorhizobium* on the performance of chickpea grown in insecticide stressed alluvial soils. Journal of Crop Science and Biotechnology. 12(4): 217-226.

Ahmad, F., I. Ahmd and M. S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research. 163: 173-181.

Ahmad, F., I. Ahmd and M. S. Khan. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turkish Journal of Biology:29-34.

Alikhani, H. A., H. Etesami and L. Mohammadi. 2010. Effect of superior indole-3-acetic acid producing Rhizobia and the combination with Ag and L-tryptophan on wheat growth indices under in vitro conditions. Journalof Food, Agriculture and Enviroment. 8(3&4): 949-954.

Datta, C. and P. S. Basu. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, Cajanus cajan.Microbiological Research. 155: 123-127.

Deora, G. S. and K. Singhal. 2010. Isolation, biochemical characterization and preparation of biofertilizers using *Rhizobium* streins for commercial use. Bioscience Biotechnology Research Communications. 3(2): 132-136.

Erum, S. and A. Bano. 2008. Variation in Phytohormone Production in *Rhizobium* Strains at different altitudes of northern areas of Pakistan. International Journal of Agriculture and Biology. 10(5): 536–540.

Etesami, H., H. A. Alikhani and N. S. Rastin. 2008. The effect of superior IAA producing Rhizobia and their combination with Ag and Trp on wheat growth indices. World Applied Sciences Journal. 5(3): 272-275.

Finnie, J. F. and J. VanStaden. 1985. Effect of seed weed concentrate and applied hormones on in vitro cultured tomato roots. Journal Plant Physiology. 120: 215-222.

Holt, J. G., N. R. Krieg and P. A. P. Sneath. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology.9th Ed, Williams and Wilkins Pub, Baltimore.

Islam, R. 1981. Nodulation Aspects of winter-planted chickpeas. Proceedings of the workshop on Ascochyta blight and winter sowing of chickpeas (Saxena, M.C. and Singh, K.B., eds.). ICARDA, Aleppo, Syria: 159-166.

Joseph, B., R. RanjanPatra and R. Lawrence. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Plant Production. 1(2): 141-152.

Kantar, F., E. Elkoca, H. Ogutcu and O. F. Algur. 2003. Chickpea yields in relation to Rhizobium inoculation from wild chickpea at high altitudes. Journal of Agronomy and Crop Science. 189: 291-297.

Mirza, B. S., M. SajjadMirza, A. Bano and K. A. Malik. 2007. Coinoculation of chickpea with *Rhizobium* isolates from roots and nodules and phytohormone-producing *Enterobacter* strains. Australian Journal of Experimental Agriculture. 47(8): 1008-1015.

Minamisawa, K., K. I. Ogawa, H. Fukuhara and J. Koga. 1996. Indolepyruvate Pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii.* Plant and Cell Physiology. 37(4): 449-453.

Muller, M., C. Deigele and H. Ziegler. 1989. Hormonal interactions in the rhizospheres of maize (*Zea mays* L.) and their effect on plant development. Z Pflanzenernahar. Bodenkd. 152: 247-254.

Obaton, M., L. Materon, M. Zaklouta and G. Gintzburger. 1996. Effect of low temperature on the nitrogen nutrition of annual medics: Preliminary results. Cahiers Options Méditerranéennes. CIHEAM. 18: 103-112.

Patten, C. L. and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology. 68(8): 3795–3801.

Raczkowska-Blach, E., H. Rozycki, E. Strzelczyk, A. Pokojska. 1995. Decompotition of indole acetic acid IAA in soil and by bacterial strains isolated from soil and from root zone of Scots pine. Microbiological Research. 150(3): 265-270.

Reetha, S., G. Bhuvaneswari, P. Thamizhiniyan and T. RaviMycin. 2014. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allimcepa*.L). International Joutnal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(2): 568-574.

Sahasrabudhe, M. M. 2011. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. Annals of Biological Research. 2(4): 460-468.

Shahab, S., N. Ahmed and N. S. Khan. 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. African Journal of Microbiology Research. 4(11): 1312-1316.

Sridevi, M. and K. V. Mallaiah. 2008. Production of indole-acetic-acid by Rhizobium isolates from *Sesbania* species. Plant Sciences Research. Medwell Journals. 1(1): 13-16.

Sridevi, M. and K. V. Mallaiah. 2007. Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban*(L.) Merr. Iranian Journal of Biotechnology. 5(3): 178-182.

Stein, A., JA. Fortin and G. Vallee. 1985. Enhanced rooting of *Piceamariana* cuttings by ectomycorrhizal fungi. Canadian Journal of Botany. 68:492-498.

Tien, T. M., M. H. Gaskins and D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillumbrasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetumamericanum* L.). Applied and Enviromental Microbiology. 37(5): 1016-1024.

Yamakawa, T., O. Kurahashi, K. Ishida, S. Kato, T. Kodama and Y. Minoda. 1979. Stability of indole-3 acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination. Agricultural and Biological Chemistry. 43(4): 879-880.

Received	**2014/11/03**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2015/04/14**	**قبول البحث للنشر**