تأثير جراثيم المحيط الجذري المعززة للنمو (PGPR) في بعض المؤشرات الشكلية والحيوية الكيميائية لنبات الكرفس

إيمان إبراهيم* [(1)] ونجوى مسلماني*[(1)] وعماد الدين الخلف*[(1)] وعبير الرمو*[(1)]

(1). قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة حلب، حلب، سورية.

(*للمراسلة: إيمان إبراهيم، البريد الالكتروني: iman.sy@hotmail.com)

تاريخ الاستلام:2022/08/26 تاريخ القبول:2022/10/9

الملخص:

هدف البحث للتحري عن قدرة الجراثيم المعزولة من المحيط الجذري لنبات الكرفس على تحفيز نمو النبات في تجارب ضمن الأصص، تم بداية تحضير لقاح جرثومي بتركيز (5×10^{-8}) مستعمرة CFU/مل لخمس عزلات تابعة للجنسين *Bacillus* و*pseudomonas* وهي: *Pseudomonas putida* و *P. aeruginosa* و*Bacillus subtilis* و *B. cereus* و *B. thuringiensis*، ونقعت بذور نبات الكرفس بالتراكيز المحضرة من هذه العزلات لمدة أربعة ساعات، وزرعت بعدها البذور في أصص وبعد اكتمال فترة نمو النبات درست قدرة الجراثيم على زيادة كل من مؤشرات النمو الخضري والمؤشرات الحيوية الكيميائية، حيث بينت النتائج أن العزلات الجرثومية كانت قادرة على تحسين النمو وذلك من خلال زيادة أطوال المجموعين الجذري والخضري وزيادة الأوزان الرطبة للنبات، كما زادت عدد الأوراق والجذور بتأثير اللقاح الجرثومي، بالإضافة إلى ذلك سجلت النباتات المعاملة باللقاح الجرثومي للأنواع المختبرة زيادة في قيم الكلوروفيل (A و B والكلوروفيل الكلي) والكاروتينات، وأظهرت النتائج التأثير الإيجابي للقاح الجرثومي في المحتوى الكلي للفينولات في جميع النباتات المختبرة وزيادة الفعالية المضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: الكرفس. لقاح جرثومي. الجراثيم المحفزة للنمو. الفينولات. الفعالية المضادة للأكسدة.

المقدمة:

أدى الاستخدام العشوائي والمفرط للأسمدة الكيميائية في القطاع الزراعي، وخاصة عنصري الآزوت والفوسفور، إلى تلوث كبير للماء والهواء والتربة، وما تحويه من كائنات حية دقيقة، بالإضافة إلى تراجع خصوبتها حيث أن استخدام هذه الأسمدة على المدى الطويل يمكن أن يؤدي إلى تقليل درجة حموضة التربة مما يجعلها غير صالحة للزراعة وبالتالي تراجع إنتاجية المحاصيل (Gupta *et al.*, 2014)، مما يستدعي تبني استراتيجيات بديلة ومستدامة للحفاظ على خصوبة التربة مع زيادة إنتاج المحاصيل مع تقليل استخدام الأسمدة الكيماوية، حيث استخدمت جراثيم المحيط الجذري المعززة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) في مختلف مجالات القطاع الزراعي التي تشمل المبيدات والأسمدة والصادات الحيوية (Karnwal, 2017)، حيث يمكن أن تلعب جراثيم PGPR دوراً مهماً كداعم للكيماويات الزراعية (Adnan *et al.*, 2016).

تتواجد جراثيم PGPR في منطقة المحيط الجذري للنباتات، وتستفيد منها النباتات، بتعزيز النمو وتسهل امتصاص بعض العناصر الغذائية مثل الفوسفور وتثبيت الآزوت وإنتاج مخلبات الحديد وانتاج الهرمونات النباتية والمكافحة الحيوية لمسببات الأمراض النباتية من خلال إنتاج الصادات الحيوية وغاز سيانيد الهيدروجين (Mhatre *et al*., 2019) (Goswami *et al*., 2016). حيث تعد الجراثيم التابعة لجنس العصويات *Bacillus* spp. والزوائف *Pseudomonas* spp. والمستجذرة *Rhizobium* spp. أكثر الجراثيم استخداماً في مجال التسميد الحيوي (Shakeela *et al*., 2017). ففي دراسة (Panchami *et al*., 2020) أدى تطبيق لقاحات *Bacillus subtilis* لزيادة أطوال المجموع الخضري والجذري وزيادة تشكيل الجذور الجانبية لنبات *Elettaria cardamomum*، وبيّنت دراسة (Khan *et al*., 2016) دور *B. subtilis* عند تطبيقها على بذور نبات البندورة إلى زيادة كبيرة في الكتلة الحيوية للمجموعين الخضري والجذري وزيادة محتوى اليخضور (أ وب) بالمقارنة مع الشاهد. كما بينت دراسة (Rahman *et al*., 2018) أن الرش الورقي لنبات الفريز بجراثيم *B. amyloliquefaciens* أدى إلى زيادة الفعالية المضادة للأكسدة من خلال زيادة المركبات الفينولية والفلافونوئيدية والكاروتينات وغيرها من مضادات الأكسدة. كما أظهر نبات الذرة نشاطاً مضاداً للأكسدة متزايداً عند التلقيح بـ *Bacillus subtilis* بنسبة وصلت إلى (34) % (Lima *et al*., 2019).

يعد نبات الكرفس (*Apium gravolens* L.) من أهم الخضروات في الفصيلة الخيمية Apiaceae ويزرع في جميع أنحاء العالم ويستخدم في الصناعات الغذائية والتجميلية لكونه مصدراً كبيراً للفيتامينات والبروتينات والمركبات الفينولية والزيوت المتطايرة، بالإضافة إلى أهميته في الصناعات الدوائية بسبب خصائصه الطبية المختلفة، كمضاد للجراثيم والالتهابات وخافض للسكر والشحوم. لذا جاء هذا البحث بهدف دراسة تأثير الجراثيم المعزولة من المحيط الجذري لنبات الكرفس في مؤشرات النمو والفعاليات الكيميائية الحيوية الكرفس.

2. مواد وطرائق العمل:

2-1- تحضير اللقاح الجرثومي:

تم استخدام خمسة أنواع جرثومية معزولة من المحيط الجذري لنبات الكرفس وهي: *Pseudomonas putida* و *P. aeruginosa* و *Bacillus subtilis* و *B. cereus* و *B. thuringiensis*. تم عزلها وتحديد هويتها في دراسة أجريت سابقاً، حضر اللقاح الجرثومي من هذه الجراثيم بحسب طريقة (Vincent ,1970) بعد زراعة الجراثيم على الوسط المغذي، تم نقل مستعمرة جرثومية نقية ومفردة من كل نوع إلى أرلنماير يحوي (100) مل من الوسط Nutrient Broth ووضعت الأنابيب في حاضنة هزازة على درجة حرارة (30) م° لمدة (48) ساعة، ثفلت الأنابيب بعدها لمدة عشر دقائق بسرعة (5000) دورة /الدقيقة، ومن ثم تم تجهيز لقاح جرثومي لكل عزلة مختبرة من الجراثيم بتركيز 5×10^{-8} خلية/مل.

2-2- اختبارات مؤشرات النمو لنبات الكرفس:

طهرت بذور الكرفس بنقعها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز (10) % لمدة (5) دقائق، لقحت البذور عن طريق نقعها لمدة (4) ساعات بالتركيز المحضر من الأنواع الجرثومية كل على حده، واستخدم الماء المقطر لنقع البذور كشاهد، تم توزيع البذور المعاملة بالجراثيم المختبرة في أصص زراعية بقطر (20) سم وعمق (30) سم، تم سقاية جميع الأصص بكمية متساوية من ماء الصنبور كل (48) ساعة. وفي نهاية التجربة التي استمرت ثمانية أشهر تم تسجيل مؤشرات النمو الخضري الشكلية والكيميائية الحيوية والمتمثلة بأطوال المجموعين الخضري والجذري، أوزان المجموعين الخضري والجذري، بالإضافة إلى بالمؤشرات الآتية:

2-3-قياس تركيز الأصبغة النباتية:

تم قياس تركيز الكلوروفيل والكاروتين بحسب طريقة (Arnon, 1949)، حيث تم سحق (100) مغ من الأوراق في (10) مل من الأسيتون (80) % تم بعدها إجراء الطرد المركزي للمحلول عند (1000) دورة/الدقيقة لمدة (20) دقيقة أزيلت المادة الطافية، وقرئت الامتصاصية عند (645) و(663) نانومتر للكلوروفيل وعند (480) نانومتر للكاروتينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي.

2-4-تحديد المحتوى الكلي من الفينولات:

تم تحديد المحتوى الكلي من المركبات الفينولية في خلاصات نبات الكرفس بحسب طريقة (Singleton *et al*., 1999). حيث تم تحضير المحلول الميثانولي لكل خلاصة بتركيز (1) مغ/مل، وكذلك تم تحضير سلسلة عيارية من حمض الغاليك بتراكيز متزايدة (0.005، 0.01، 0.02، 0.04، 0.06، 0.08) مغ/مل. أخذ (1) مل من العينات المختبرة ووضعت في أنبوب اختبار، وأخذ (1) مل من كل محلول عياري لحمض الغاليك، ووضع في أنابيب اختبار أيضاً. أضيف لكل أنبوب اختبار (2.5) مل من كاشف فولين-سيوكالتو (10) % و(2.5) مل من محلول كربونات الصوديوم (6) % تم تحضير عينة شاهدة بإضافة (2.5) مل من كاشف الفولين إلى (1) مل من الماء المقطر، ووضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة (40) مئوية لمدة (30) دقيقة، ثم قيست امتصاصية المحاليل عند طول موجة (734) نانومتر. تم رسم الخط البياني لتغير امتصاصية المحاليل بدلالة تغير التركيز، وحسبت كمية الفينولات على أساس عدد المليغرامات من مكافئ حمض الغاليك في كل (1) غ من وزن النبات الجاف (مغ GA/غ وزن جاف) (Abbasifar, 2020).

2-5-تحديد الفعالية المضادة للأكسدة:

تم تحضير محلول DPPH في الميثانول بتركيز 0.135 ميلي مول، حيث أخذ (1) مل من هذا المحلول، ومزج مع (1) مل من الخلاصات بتراكيز متدرجة. قيست الامتصاصية عند طول الموجة (517) نانو متر بعد 30 دقيقة من الحضن في الظلام، حددت النسبة المئوية للتأثير الكابح للجذر الحر DPPH% وفق المعادلة التالية: $\%DPPH = 100 \times (A_0-A_1)/A_0$ حيث: A_0 امتصاصية المحلول الشاهد، A_1 امتصاصية العينة المختبرة. وللتعبير عن الفعالية المضادة للأكسدة اعتمدت قيمة (IC_{50}) وهي التركيز الموافق لتثبيط (50) % من الجذر الحر DPPH (Apak *et al*., 2013) ، حيث تم حساب IC_{50} من المنحني البياني للنسبة المئوية للتثبيط بدلالة التركيز.

3- التحليل الاحصائي:

تم إجراء التحليل البياني ANOVA ومقارنة المتوسطات ما بين المعاملات باستخدام أقل قيمة فرق معنوية LSD عند مستوى 5٪ باستخدام برنامج SPSS vers. (2016).

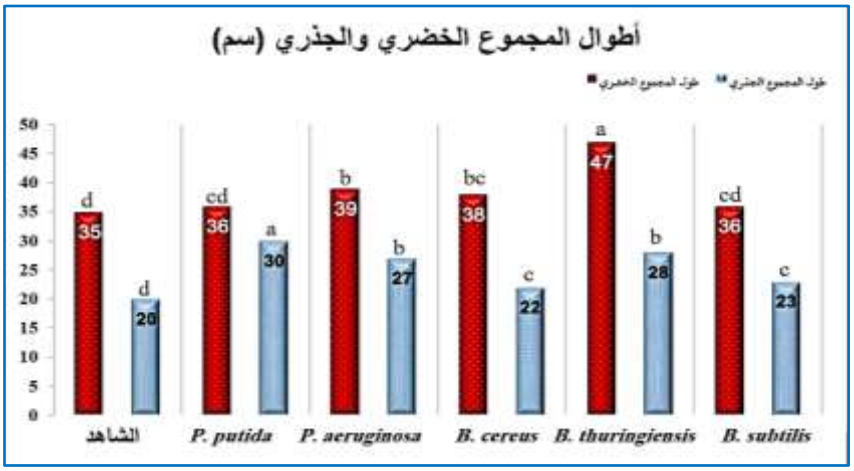
4- النتائج:

4-1- تأثير اللقاح الجرثومي في المؤشرات الشكلية للنمو الخضري:

4-1-1- أطوال المجموعين الخضري والجذري:

تشير النتائج الواردة في الشكل (1) إلى ارتفاع معنوي في قيم أطوال المجموع الخضري والجذري لنبات الكرفس المعاملة باللقاح الجرثومي للعزلات المختبرة مقارنة مع الشاهد، حيث تراوح طول المجموع الخضري بين (36) سم عند التلقيح بالنوعيين الجرثوميين *P. putida* و *B. subtilis*، و(47) سم عند التلقيح بـ *B. thuringiensis*، مقارنة بمعاملة الشاهد والتي سجلت قيمة وقدرها (35) سم، أما بالنسبة لمؤشر أطوال المجموع الجذري لنباتات الكرفس فقد تراوحت أطوال المجموع الجذري بين (22-30)

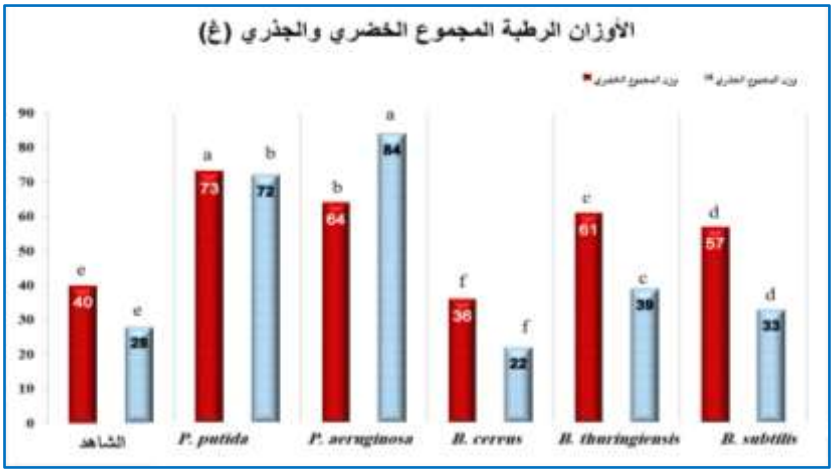
سم عند التلقيح بالنوعين *P. putida* و *B. cereus* على التوالي بالمقارنة مع الشاهد (20) سم، وسجلت النباتات الملقحة بالجراثيم *B. thuringiensis* قيمة وصلت إلى (28) سم، أما عند التلقيح *P. aeruginosa* فقد وصلت القيمة إلى (27) سم.



الشكل (1) تأثير اللقاح الجرثومي في متوسط أطوال المجموع الخضري لنبات الكرفس (سم)

4-1-2- الوزن الرطب للمجموعين الخضري والجذري:

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود زيادة معنوية في مؤشر الوزن الرطب للمجموع الخضري والجذري لجميع المعاملات مقارنة بالشاهد، باستثناء النباتات المعاملة بالنوع الجرثومي *B. cereus* حيث تراوحت الأوزان الرطبة للمجموع الخضري بين (36-73) غ عند التلقيح بالنوعين *B. cereus* و *P. putida* على التوالي، فيما سجلت قيمة الشاهد (40) غ. كما أظهر التلقيح بجراثيم *P. aeruginosa* زيادة معنوية وصلت إلى (64) غ. أما بالنسبة لمؤشر الوزن الرطب للمجموع الجذري فقد وصلت أعلى قيمة عند التلقيح بالنوع *P. aeruginosa* (84)غ، وأدنى قيمة عند التلقيح بالنوع *B. cereus* فيما سجلت معاملة الشاهد قيمة وصلت إلى (22)غ، كما هو موضح في الشكل (2).

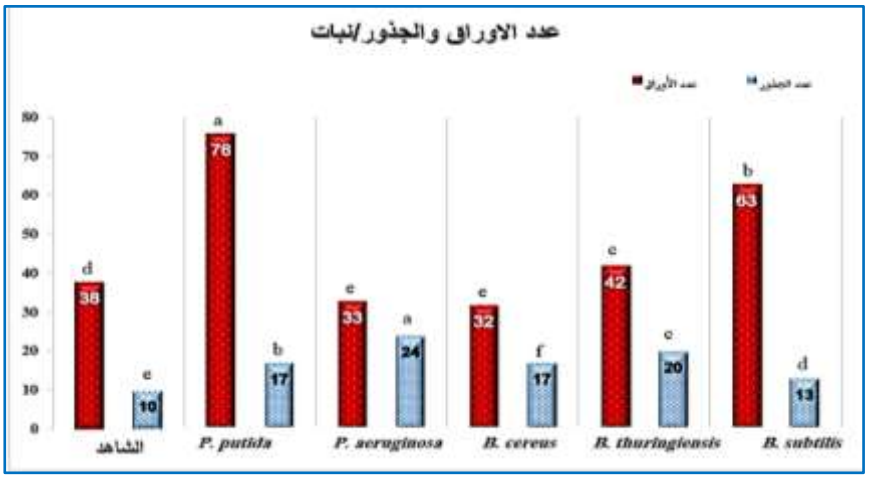


الشكل (2): تأثير اللقاح الجرثومي في متوسط الأوزان الرطبة للمجموع الخضري والجذري لنبات الكرفس (غ)

4-1-3-عدد الأوراق والجذور:

أظهرت النتائج في الشكل (3). وجود زيادة معنوية في مؤشر عدد الأوراق للنباتات المعاملة باللقاح الجرثومي مقارنة مع معاملة الشاهد، حيث وصلت أعلى قيمة إلى (76) ورقة/نبات عند المعاملة بجراثيم *P. putida* تلتها النباتات المعاملة بجراثيم *B. subtilis* بقيمة وصلت إلى (63) ورقة/نبات، في حين سجلت أدنى قيمة عند المعاملة بجراثيم *B. cereus* (32) ورقة/نبات، بينما سجلت معاملة الشاهد (38) ورقة/نبات. أما بالنسبة لعدد الجذور فقد سجلت ازدياداً في جميع العزلات المستخدمة بالمقارنة مع

الشاهد، حيث وصلت أعلى قيمة (24) جذر/نبات عند النباتات المعاملة بالنوع *P. aeruginosa* تلتها النباتات المعاملة بالنوع *B. thuringiensis*، حيث بلغ عدد الجذور (20) جذر/نبات، في حين سجلت أدنى قيمة عند النباتات المعاملة بـ *B. subtilis* (13) جذر/نبات، فيما بلغ عدد جذور الشاهد (10) جذور/نبات.



الشكل (3): تأثير الوِلات الجرثومية في متوسط أعداد الأوراق و الجذور لنبات الكرفس

أظهرت نباتات الكرفس المعاملة باللقاح الجرثومي تحسناً واضحاً في جميع المؤشرات الشكلية للنمو الخضري وقد توافقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج عدد من الدراسات السابقة، فقد أظهرت الدراسة (Dahunsi and Ogunrinola, 2014) أن تطبيق التلقيح بـ *Bacillus* spp. أدى إلى زيادة مؤشرات النمو لنبات البندورة من حيث زيادة في ارتفاع النبات وعدد الفروع ومساحة الأوراق. كما أظهرت الدراسة (Akintokun *et al.*, 2019) أن تلقيح بذور البندورة بـ *B. thuringiensis* أدت إلى تحسين مؤشرات ارتفاع النبات ومحيط الساق بالمقارنة مع الشاهد. كما أدى تطبيق *B. thuringiensis* إلى زيادة في كل من طول ووزن المجموعين الخضري والجذري لنبات القمح (Sheirdi *et al.*, 2019). وأشارت الدراسة (Khan and Siddiqui, 2019) أن معاملة نبات الشمندر بجراثيم *P. putida* أدى إلى تعزيز نمو جذور النبات. وبينت نتائج الدراسة (Ali *et al.*, 2011) أن مؤشرات نمو نبات القمح ازدادت بفروقات معنوية كبيرة عند تلقيح البذور قبل الزراعة بـ *Pseudomonas putida* مقارنة مع الشاهد. فيما أظهرت الدراسة (Skz *et al.*, 2018) أن جراثيم الزائفة الزنجارية قد ساهمت بنمو نبات القمح من خلال إنتاج عديدات السكريات الخارجية (exo-polysaccharides) التي تعزز من قدرة النبات على الاحتفاظ بالماء في منطقة الجذور، مما ساهم في زيادة نمو الجذور والكتلتها الحيوية.

يمكن تفسير هذه الزيادة في مؤشرات النمو كون جراثيم PGPR تقوم بالعديد من الآليات الحيوية المختلفة والتي لها تأثيرات إيجابية في النمو النباتي كعملية تثبيت الآزوت وبالتالي تحسين وصول عنصر الآزوت إلى الأوراق (Thakur and Sharma, 2018)، كما أنها تعمل على إذابة الفوسفات وتحويله إلى الشكل المتاح امتصاصه من قبل النبات، حيث يعد الفوسفور من أهم العناصر الضرورية لانقسام الخلايا وزيادة تشكيل الأنسجة الحية (Nyaera *et al.*, 2019). ومن ناحية أخرى فإن جراثيم PGPR تعمل على تعزيز إنتاج الهرمونات النباتية مثل الأوكسينات والجبريلينات والسيتوكينينات، والتي تعمل على تحسين انقسام واستطالة الخلايا النباتية، مما يعمل على زيادة نمو النبات وتطوره (Cappellari *et al.*, 2013) وهذا ما يفسر التأثير الإيجابي للعزلات المستخدمة والتي تتبع إلى جنس العصويات *Bacillus*، وجنس الزوائف *Pseudomonas*، حيث تعد من أكثر الأنواع الجرثومية انتشاراً في التربة، واستعماراً للمحيط الجذري وذلك لقدرتها على إنتاج المركبات الممخلبة للمعادن والانزيمات والهرمونات

النباتية والمواد السامة مثل المضادات الحيوية للكائنات الدقيقة الأخرى (Oluwambe and Kofoworola, 2016). وبالتالي انعكس ذلك على زيادة أطوال المجموع الخضري والجذري للنبات كما أظهرت ذلك نتائج الدراسة الحالية. أما بالنسبة لمؤشر الوزن الرطب للمجموع الخضري والجذري لنباتات الكرفس المعاملة باللقاح الجرثومي فقد تعود الزيادة بشكل رئيس إلى ارتفاع إنتاج هرمون حمض الاندول الخلي الذي يحسّن مساحة سطح الجذور وبالتالي امتصاص المغذيات بشكل أكبر وذلك من خلال زيادة انتاج الجذور الثانوية وتشكيل الشعيرات الجذرية (Pereira *et al.*, 2020). والتي تؤدي إلى زيادة مؤشرات النمو النباتي كارتفاع النبات والمسافات بين العقدية ومساحة الأوراق وغيرها من الصفات الشكلية. أثبتت جميع العصويات المستخدمة في هذه الدراسة قدرتها على إنتاج حمض الإندول الخلي بنسب مختلفة، حيث تمتص الخلايا النباتية بعضاً من IAA والذي يحفز تكاثر الخلايا النباتية جنبًا إلى جنب مع هرمون النمو المفرز من قبل خلايا النبات (Santos *et al.*, 2020). وقد تعود تلك الزيادة إلى إنتاج حمض الحديد الذي يلعب دوراً مهمًا في تعزيز الوزن الجاف من خلال التثبيت الحيوي للآزوت لأن إنزيم النيتروجيناز يتطلب الكثير من الحديد لعمله وبالتالي زيادة في الوزن الجاف للنبات. وقد توافقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة (Sezen *et al.*, 2016) حيث أثّرت جراثيم *P. putida* و*B. cereus* بشكل إيجابي في نمو نبات القمح وأدت إلى زيادة أوزان المجموعين الخضري والجاف بالإضافة إلى زيادة محتوى النبات من البروتين. كما أثّرت *B. subtilis* على نبات *Eragrostis tef* وأدت إلى زيادة في أطوال الجذور والوزن الجاف للجذر بنسبة (27) % بالمقارنة مع الشاهد (Woyessa and Assefa, 2011).

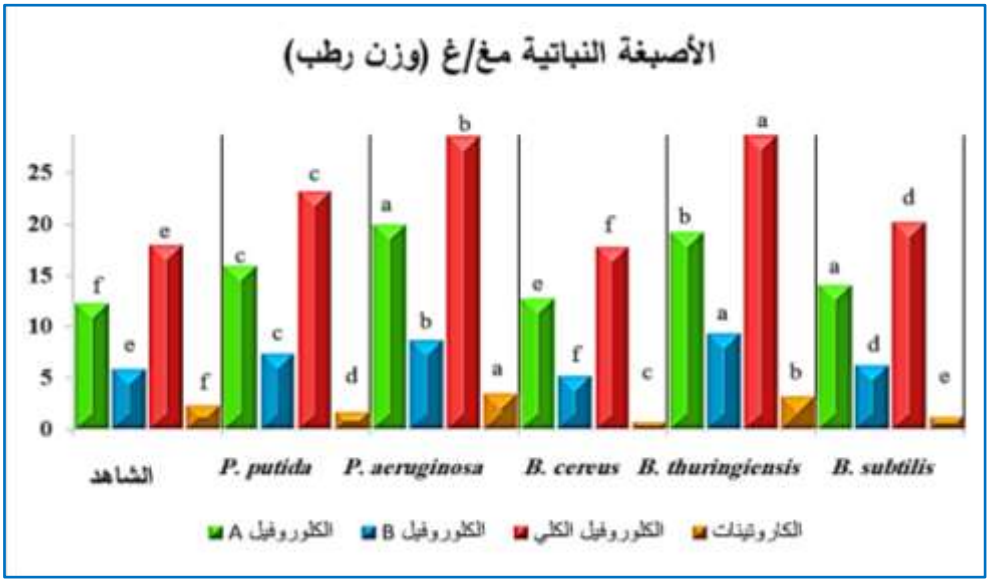
4-2- تأثير اللقاح الجرثومي في المؤشرات الحيوية الكيميائية:

4-2-1-الأصبغة النباتية:

بينت نتائج تقدير محتوى الأصبغة النباتية للكرفس المشار إليها بالشكل (4) ارتفاعاً بفروقات معنوية عند التلقيح بالجراثيم المختبرة، حيث سجلت النباتات المعاملة باللقاح الجرثومي للنوع *B. thuringiensis* أعلى القيم بالنسبة للكلوروفيل (A و B والكلوروفيل الكلي) بمقدار (19.2 و9.3 و28.7) مغ/غ وزن رطب على التوالي، بينما كانت قيم معاملة الشاهد لكل من الكلوروفيل (A و B والكلي هي (12.3 و5.8 و17.9) مغ/غ وزن رطب، في حين أظهر التلقيح بالنوع الجرثومي *B. cereus* أدنى القيم (19.2 و9.3 و28.7) بالنسبة للكلوروفيل A و B والكلي على التوالي، أما بالنسبة للكاروتينات فقد بينت النتائج الواردة في الشكل (2) أن محتوى الكاروتينات ازداد عند معاملة النباتات باللقاح الجرثومي، وكانت أعلى قيمة (1.469) مغ/غ وزن رطب سجلت عند معاملة النبات بجراثيم *P. aeruginosa* بالمقارنة مع الشاهد (0.691) مغ/غ وزن رطب تلتها النباتات المعاملة بالعزلتين *B. thuringiensis* و *B. cereus* حيث وصلت قيمة الكاروتينات إلى (1.1102 و 0.897) مغ/غ وزن رطب على التوالي.

وتعزى زيادة الأصبغة النباتية في النباتات المعاملة باللقاح الجرثومي إلى قدرة الأنواع الجرثومية على انتاج مركبات السايدروفور (Ji *et al.*, 2014) حيث أن زيادة مستويات الحديد تؤثر في العديد من العمليات الحيوية في النباتات كزيادة الانقسامات الخلوية واستطاله الخلايا وبالتالي زيادة معدل النمو النسبي للنباتات وزيادة نسبة الصانعات الخضراء بشكل خاص. فعمل الصانعات الخضراء مرتبط بشكل رئيس بالمعادن الناقلة مثل عنصر الحديد والذي يعد ضرورياً لعمل النواقل الالكترونية المشاركة في عملية التركيب الضوئي مثل السيتوكرومات والفيروكسينات وهي مركبات بروتينية تحوي الحديد (Pham *et al.*, 2020). كما أن الصانعات الخضراء الأغنى بالحديد في الخلايا النباتية تحتوي على (80-90) % من الحديد الموجود في الخلايا (López-Millán *et al.*, 2016). كما تبين الدراسات وجود ارتباطات بين محتوى عنصر الحديد في النبات وتشكيل الأصبغة اليخضورية. وبالمقارنة مع دراسة (Morals *et al.*, 2001) فقد بينت النتائج أن زيادة الحديد بشكل ملحوظ تؤدي إلى زيادة في عملية التركيب الضوئي بسبب

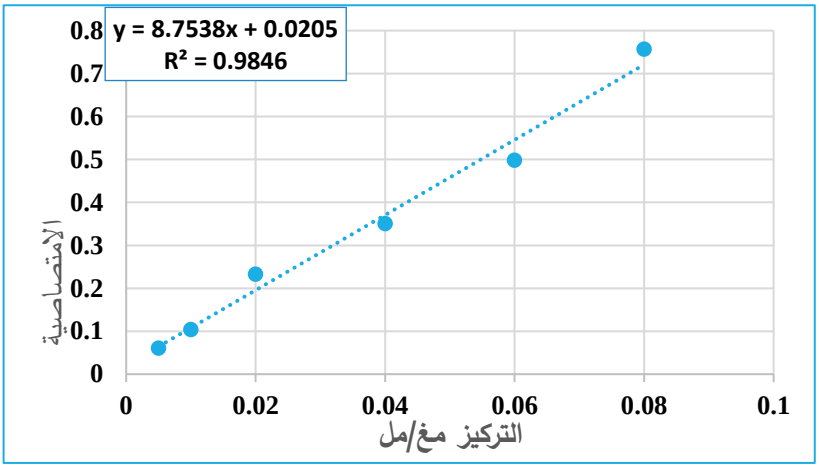
زيادة عدد الصانعات الخضراء ورافق ذلك زيادة في مكونات الأغشية بما في ذلك النواقل الالكترونية في سلسة نقل الالكترون الضوئي وأصبغة الكلوروفيل والكاروتين. وقد يرجع السبب الى قدرة جراثيم PGPR على تثبيت الآزوت بصورة حرة وهذا يلبي حاجة النبات من هذا العنصر الذي يعد أحد المكونات الداخلة في حلقة البيروفيرن Pyroferin وهي إحدى المركبات المهمة في بناء جزيئة الكلوروفيل (Zaferanchi., *et al*., 2019). كما يساهم الآزوت في تحسين التركيب الضوئي مما يؤدي لزيادة في تركيب الأحماض الآمينية والبروتينات والحموض النووية، كل هذا ربما يسهم في زيادة النمو الخضري للنبات وانعكاسه في تحسين الصفات النوعية (Mamnabi, 2020). ويمكن أن تكون زيادة الكلوروفيل ناتجة عن قدرة بعض جراثيم PGPR على إنتاج عدة أنواع من الهرمونات مثل السايتوكينات كجراثيم *Pseudomonas* و *B. subtilis* (Santos *et al*., 2020). وتعد السايتوكينينات من المواد الرئيسية في بناء الغرانا الأساسي لتكوين الكلوروفيل بالإضافة إلى أنها تنظم التكوُّن الحيوي للصانعات الخضراء (Cortleven and Schmulling, 2015).



الشكل (4): تأثير اللقاح الجرثومي في الأصبغة النباتية (مغ/غ وزن رطب)

4-2-2-المحتوى الكلي الفينولات:

تم حساب كمية الفينولات التي تنتجها خلاصات أوراق الكرفس المعاملة باللقاح الجرثومي، من القيم التي تم الحصول عليها من قياس عينات السلسة العيارية لحمض الغاليك، تم رسم المنحني العياري الخطي لعلاقة تغير الامتصاصية بدلالة تغير التركيز كما هو موضح في الشكل (5)، ومن خلال معادلة المنحني تم حساب الفينولات الكلية لكل من النباتات المعاملة بالعزلات المدروسة كمكافئ لحمض الغاليك، جدول (1).



الشكل (5): العلاقة بين تغير امتصاصية حمض الغاليك وتغير التركيز

حيث أظهرت النتائج التأثير الايجابي للقاح الجرثومي في المحتوى الكلي للفيولات في جميع النباتات المختبرة مقارنة بالشاهد، وسجلت أعلى قيمة عند النباتات المعاملة بالنوع *P. aeruginosa* (0.27) مغ/غ محسوباً كمكافئ لحمض الغاليك مقارنة بمعاملة الشاهد التي سجلت (0.11) مغ/غ. وكذلك فقد أظهرت المعاملة بالنوع الجرثومي *P. putida* قيمة وصلت إلى (0.19) مغ/غ، فيما وصلت قيمة الفينولات إلى (0.17) (مغ/غ مكافئ لحمض الغاليك أسيد) عند المعاملة الجراثيم *B. thuringiensis*.

الجدول (1): المحتوى الكلي للفينولات (مغ/غ مكافئ لحمض الغاليك)

المؤشر	الشاهد	العزلات				
		P. putida	*P. aeruginosa*	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. subtilis*
كمية الفينولات	0.11	0.19	0.27	0.16	0.17	0.15

إن زيادة المحتوى الكلي للفينولات عند التلقيح بجراثيم PGPR المعزولة من المحيط الجذري للكرفس، يمكن أن يعود إلى قدرة هذه الجراثيم على إنتاج مركبات السايدروفور، التي تعمل على تزويد النبات بكمية إضافية من الحديد، والذي يحفّز العديد من الأنزيمات التي تغذي مسار أسيتات شيكيمات acetate shikimate pathway (Zaferanch *et al.*, 2019). مثل أنزيم السيتوكوروم cytochrome P450s وأنزيم Fe^{2+}/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases و UDP-glycosyltransferases حيث يتشكل من خلال هذا المسار العديد من المستقلبات الثانوية مثل الليغنينات lignins والحموض الفينولية والفلافونوئيدات والتانينات وجميع المستقلبات الثانوية الفينولية الرئيسية الأخرى (Tohge *et al.*, 2013). وتبدي هذه المركبات الفينولية تأثيراً على عمليات النمو وتحفيز إنقسام الخلايا واصطناع البروتين والفسفرة التأكسدية وتوافقت هذه النتيجة مع دراسة (Chiappero *et al.*, 2019) على نبات النعناع من حيث تحسين المحتوى الكلي للفينولات وذلك عند التلقيح بنوعين من جراثيم PGPR مثل *P. fluorescens* و*B. amyloliquefaciens*. كما أظهرت نتائج تلقيح بذور نبات البندورة بجراثيم *B. subtilis* ارتفاع قيم الفينولات الكلية والفلافونوئيدات (Chandrasekaran *et al.*, 2019).

4-2-3- مضادات الأكسدة:

بلغت قيمة IC_{50} لخلاصة أوراق الكرفس المعاملة بـ *B. subtilis* (22) ميكروغرام/مل مقارنة بالشاهد (74.2) ميكروغرام/مل، تلتها النباتات المعاملة بكل من *P. aeruginosa* و *B. cereus* حيث بلغت قيمة IC_{50} (33) و(39) ميكروغرام/مل على التوالي. وكانت قيمة IC_{50} (42.2) و(40.2) ميكروغرام/مل لكل من الأوراق المعاملة بالعزلات *P. putida* و *B. thuringiensis* على التوالي، الجدول (2).

الجدول (2): تأثير العزلات الجرثومية على قيم IC_{50} للخلاصات الميثانولية لأوراق الكرفس

المعاملة	الشاهد	*P. putida*	*P. aeruginosa*	*B. cereus*	*B. thuringiensis*	*B. subtilis*
IC_{50} ميكروغرام/مل	74.2	42.2	33	39	40.2	22

يمكن تفسير زيادة الفعالية المضادة للأكسدة للنباتات المعاملة بالعزلات الجرثومية بالمقارنة مع الشاهد من خلال زيادة كمية المركبات الفينولية التي تقوم بتثبيط النشاط السلبي للجذور الحرة المتشكلة، إذ تعد الفينولات الموجودة في النبات من المركبات الأساسية المسؤولة عن الخصائص المضادة للأكسدة. وتعود فعاليتها إلى قدرتها على الدخول بتفاعلات الأكسدة والإرجاع، حيث تلعب دوراً مهماً في امتزاز ومعادلة الجذور الحرة (Raghavendra *et al*. 2013). كما تعد الكاروتينات من المركبات المضادة للأكسدة في الخلايا النباتية تعمل من خلال مسار غير إنزيمي لتقليل الضرر التأكسدي للنبات (Zaferanchi., *et al*., 2019). حيث تحمي من أنواع الأكسجين والآزوت التفاعلية (Chandrasekara *et al*., 2019)، وهذا ما توافق مع نتائج الدراسة الحالية من حيث زيادة تحفيز أنشطة مضادات الأكسدة من خلال زيادة مستويات الكاروتينات في أوراق النبات بالمقارنة مع الشاهد. حيث يتحسن الاستقلاب الغذائي الثانوي تحت زيادة خفيفة من الحديد (50-100) ميكروغرام والذي يؤدي إلى تصنيع المزيد من الأحماض الأمينية والفينولات وغيرها من المنتجات النباتية (Zhu *et al*., 2016). تم الإشارة إلى أن المورثات المشاركة في الدفاعات المضادة للأكسدة يمكن تحفيزها عن طريق زيادة الحديد (Pham *et al*., 2020). في دراسة (Chandrasekaran *et al*., 2019) تم تعزيز مستويات مضادات الأكسدة والفينولات والفلافونوئيدات والكاروتينات والفيتامينات C من خلال تلقيح البذور بجراثيم *Bacillus subtilis*. كما ازدادت الفعالية المضادة للأكسدة من خلال زيادة أنشطة الأنزيمات المضادة للأكسدة مثل البيروكسيديز (PX) وديسموتاز الفائق (SOD)، من خلال تلقيح بذور نبات النعناع بجراثيم *P. fluorescens* (Chiappero *et al*., 2019). كما بينت دراسة (Rahman *et al*., 2018) أن معاملة نبات الفريز بالرش الورقي بالنوعيين الجرثوميين *B. amyloliquefaciens* و*Paraburkholderia fungorum* أدى إلى الفعالية المضادة للأكسدة من خلال زيادة مضادات الأكسدة غير الأنزيمية مثل المركبات الفينولية والفلافونوئيدية والانثوسيانين والكاروتينات وغيرها. كما أظهرت الذرة نشاطاً مضاداً للأكسدة متزايداً عند التلقيح بجراثيم *B. subtilis* بنسبة وصلت إلى (34) % (Lima *et al*., 2019).

الخلاصة:

- تم في هذه الدراسة تلقيح بذور الكرفس بالجراثيم المعزولة من المحيط الجذري للنبات، وهي *Pseudomonas putida* و *P. aeruginosa* و*Bacillus subtilis* و *B. cereus* و *B. thuringiensis*
- أشارت النتائج إلى قدرة جراثيم PGPR على تحسين نمو نباتات الكرفس من خلال زيادة أطوال المجموعين الخضري والجذري ومؤشرات النمو الخضري
- تحسنت الخصائص الكيميائية الحيوية لنباتات الكرفس المعاملة باللقاح الجرثومي من خلال زيادة الفينولات ومضادات الأكسدة في النبات
- يمكن اعتبار التلقيح بجراثيم المحيط الجذري المعززة للنمو من المحيط الجذري لنبات الكرفس ممارسة مستدامة وغير مكلفة اقتصادياً لتعزيز نمو النباتات
- إجراء المزيد من الدراسات حول تأثير هذه العزلات الجرثومية على محاصيل زراعية مختلفة.

المراجع:

Abbasifar, A., Shahrabadi, F., & ValizadehKaji, B. (2020). Effects of green synthesized zinc and copper nano-fertilizers on the morphological and biochemical attributes of basil plant. *Journal of Plant Nutrition*, *43*(8), 1104-1118.

Adnan, M., Patel, M., Reddy, M. N., Khan, S., Alshammari, E., Abdelkareem, A. M., & Hadi, S. (2016). Isolation and characterization of effective and efficient plant growth-promoting rhizobacteria from rice rhizosphere of diverse paddy fields of indian soil. *ARPN Journal of agricultural and biological science*, *11*, 9.

Akintokun, A. K., Ojesola, C. O., Akintokun, P. O., & Oloyede, A. R. (2019). Antagonistic effect of Bacillus thuringiensis for the control of bacterial wilt of tomato (Lycopersicon esculentum Mill). *Nigerian Journal of Biotechnology*, *36*(1), 94-102.

Ali, S. Z., Sandhya, V., Grover, M., Linga, V. R., & Bandi, V. (2011). Effect of inoculation with a thermotolerant plant growth promoting Pseudomonas putida strain AKMP7 on growth of wheat (Triticum spp.) under heat stress. *Journal of Plant Interactions*, *6*(4), 239-246.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., SchaichÖzyürek, M. and Güçlü, K. (2013) Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity. Pure and Applied Chemistry, 85, 957-998.

Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24:1–15.

Cappellari, L., Santoro, M. V., Nievas, F., Giordano, W., & Banchio, E. (2013). Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied soil ecology*, *70*, 16-22.

Chandrasekaran, M., Chun, S. C., Oh, J. W., Paramasivan, M., Saini, R. K., & Sahayarayan, J. J. (2019). Bacillus subtilis CBR05 for tomato (Solanum lycopersicum) fruits in South Korea as a novel plant probiotic bacterium (PPB): Implications from total phenolics, flavonoids, and carotenoids content for fruit quality. Agronomy, 9(12), 838.

Chiappero, J., del Rosario Cappellari, L., Alderete, L. G. S., Palermo, T. B., & Banchio, E. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in Mentha piperita grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. Industrial Crops and Products, 139, 111,553.

Cortleven, A., and Schmulling, T. (2015). Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. J. Exp. Bot. 66, 4999–5013.

Dahunsi, S. O., & Ogunrinola, G. A. (2018, November). Improving soil fertility and performance of tomato plant using the anaerobic digestate of tithonia diversifolia as Bio-fertilizer. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 210, No. 1, p. 012014). IOP Publishing.

Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(1).

Gupta, S., Meena, M. K., & Datta, S. (2014). Isolation, characterization of plant growth promoting bacteria from the plant Chlorophytum borivilianum and in-vitro screening for activity of nitrogen fixation, phosphate solubilization and IAA production. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, *3*(7), 1082-1090.

Ji, S. H., Gururani, M. A., & Chun, S. C. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological research*, *169*(1), 83-98.

Karnwal, A. (2017). Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from maize (Zea mays L.) rhizosphere and their plant growth promoting effect on rice (Oryza sativa L.). *Journal of Plant Protection Research*.

Khan, A.L., Halo, B.A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., et al., 2016. Indoleacetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of Solanum lycopersicum. Electron J Biotechnol 21, 58-64.

Khan, M. R., & Siddiqui, Z. A. (2019). Potential of Pseudomonas putida, Bacillus subtilis, and their mixture on the management of Meloidogyne incognita, Pectobacterium betavasculorum, and Rhizoctonia solani disease complex of beetroot (Beta vulgaris L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *29*(1), 1-14.

Lima BC, Moro AL, Santos ACP, Bonifacio A, Araujo ASF, Araujo FF (2019) Bacillus subtilis ameliorates water stress tolerance in maize and common bean. J Plant Interact 14(1):432–439.

López-Millán, A. F., Duy, D., & Philippar, K. (2016). Chloroplast iron transport proteins–function and impact on plant physiology. *Frontiers in plant science*, *7*, 178.

Mamnabi, S., Nasrollahzadeh, S., Ghassemi-Golezani, K., & Raei, Y. (2020). Improving yield-related physiological characteristics of spring rapeseed by integrated fertilizer management under water deficit conditions. Saudi journal of biological sciences, 27(3), 797-804.

Mhatre, P. H., Karthik, C., Kadirvelu, K., Divya, K. L., Venkatasalam, E. P., Srinivasan, S., ... & Shanmuganathan, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *17*, 119-128.

Morales, F., Moise, N., Quílez, R., Abadía, A., Abadía, J., & Moya, I. (2001). Iron deficiency interrupts energy transfer from a disconnected part of the antenna to the rest of Photosystem II. Photosynthesis research, 70(2), 207-220.

Nyaera, K., Mtaita, T. A., Mutetwa, M., & Masaka, T. (2019). Influence of maize seed inoculation with microbial bio fertilizers on morphological and physiological parameters of maize. *International Journal of Science & Healthcare Research*, *4*(4), 31-37.

Oluwambe, T. M., & Kofoworola, A. A. (2016). Comparison of single culture and the consortium of growth-promoting rhizobacteria from three tomatoes (Lycopersicon esculentum Mill) varieties. *Adv. Plants Agric. Res*, *5*(1), 448-455.

Panchami, P. S., Thanuja, K. G., & Karthikeyan, S. (2020). Isolation and characterization of indigenous plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from cardamom rhizosphere. *Current Microbiology*, *77*(10), 2963-2981

Pereira, S. I. A., Abreu, D., Moreira, H., Vega, A., & Castro, P. M. L. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improve the growth and nutrient use efficiency in maize (Zea mays L.) under water deficit conditions. *Heliyon*, *6*(10), e05106.

Pham, H. D., Pólya, S., Müller, B., Szenthe, K., Sági-Kazár, M., Bánkúti, B., & Solti, Á. (2020). The developmental and iron nutritional pattern of PIC1 and NiCo does not support their interdependent and exclusive collaboration in chloroplast iron transport in Brassica napus. *Planta*, *251*(5), 1-16.

Raghavendra M., Madhusudhana Reddy A., Raghuveer P., Sudharshan Rajus A., Siva Kumar L.,2013- Comparative Studies On the in Vitro Antioxidant Properties of Methanolic Leafy Extracts from Six Edible Leafy Vegetables of India. Asian Journal Experimental Science, 6(13), 96-99.

Rahman M, Sabir AA, Mukta JA, Khan MM, Mohi-Ud-Din M, Miah MG, et al. Plant probiotic bacteria Bacillus and Paraburkholderia improve growth, yield and content of antioxidants in strawberry fruit. Scientific Reports. 2018; 8(1):2504.

Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., & Rigobelo, E. C. (2020). Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: Characteristics and applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *4*, 136.

Santos, R. M., Diaz, P. A. E., Lobo, L. L. B., & Rigobelo, E. C. (2020). Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: Characteristics and applications. Frontiers in Sustainable Food Systems, 4, 136.

Sezen, A., Ozdal, M., Koc, K., & Algur, O. F. (2016). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on improving growth of wheat. *Journal of Applied Biological Sciences*, *10*(1), 41-46.

Shakeela, S., Padder, S. A., & Bhat, Z. A. (2017). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with medicinal plant Picrorhiza Kurroa. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *6*(3), 157-168.

Sheirdi, R. A., Hayat, R., Zhang, X. X., Abbasi, N. A., Ali, S., Ahmed, M., ... & Ahmad, S. (2019). Exploring potential soil bacteria for sustainable wheat (Triticum aestivum L.) production. *Sustainability*, *11*(12), 3361.

Singleton Vl. Orthofer R. Lamuela-Raventos Rm., 1999- Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299,152-178.

SkZ, A., Vardharajula, S., & Vurukonda, S. S. K. P. (2018). Transcriptomic profiling of maize (Zea mays L.) seedlings in response to Pseudomonas putida stain FBKV2 inoculation under drought stress. *Annals of Microbiology*, *68*(6), 331-349.

Thakur, K. K., & Sharma, D. P. (2018). Pot-culture studies on soil and leaf nutrients status of peach in response to different soil management techniques for preventing replant disease. *J Pharm Innov*, *7*, 1046-1053.

Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., & Fernie, A. R. (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. Frontiers in plant science, 4, 62.

Vincent JM (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publ., Oxford, UK.

Woyessa, D., & Assefa, F. (2011). Effects of Plant Growth Promoting Rhizobaceria on Growth and Yield of Tef Eragrostis tef Zucc. Trotter) under Greenhouse Condition. *Research Journal of Microbiology*, *6*(4), 343.

Zaferanchi, S., Salmasi, S. Z., Salehi Lisar, S. Y., & Sarikhani, M. R. (2019). Influence of Organics and Bio Fertilizers on Biochemical Properties of Calendula officinalis L. International Journal of Horticultural Science and Technology, 6(1), 125-136.

Zhu W, Zuo R, Zhou R, Huang J, Tang M, Cheng X, Liu Y, Tong C, Xiang Y, Dong C, Liu S (2016) Vacuolar iron transporter BnMEB2 is involved in enhancing Fe tolerance of *Brassica napus*.Front Plant Sci 7:1353.

Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Some Phological and Biochemical Parameters of Celery

Iman Ibrahim* (1) Najwa Muslmani (1) Imad aldeen ALKhalaf (1) and Abeer alramo (1)

(1). Dept. of Biology, Faculty of Science, Aleppo University, Aleppo, Syria.
(*Corresponding author: Iman Ibrahim E-mail iman.sy@hotmail.com).

Received:26/08/2022 Accepted:9/10/2022

Abstract:

The research aimed to investigate the ability of bacteria isolated from the celery rhizosphere to stimulate plant growth in pot experiments. A bacterial inoculum was prepared at a concentration of (5×10^{-8}) cfu/ml of five isolate species belonging to two genera (*Bacillus* and *pseudomonas*), which is: *Pseudomonas putida* و *P. aeruginosa*و *subtilis Bacillus*و *cereus B.* و *B. thuringiensis* ،Celery seeds were soaked in the concentrations prepared from these isolates for four hours, then the seeds were planted in pots. after the plant growth period was completed, the ability of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to increase vegetative growth and biochemical indicators was studied. the results showed that the bacterial isolates were able to improve growth by increasing the lengths of the root and shoot and increasing the fresh weights of the plant. the number of leaves and roots also increased by the effect of the bacterial inoculum. In addition, the plants treated with the PGPR recorded an increase in chlorophyll (A, B, and total chlorophyll) and carotenoids. The results also showed the positive effect of the bacterial inoculum in increasing the total content of phenols and the antioxidant activity in all tested plants.

Keywords: celery. bacterial inoculum. PGPR. Phenols. antioxidant activity.