عزل وتوصيف وتعريف الاندوفايتس من بعض النباتات النامية في منطقة العين الحارة بغميقة في المملكة العربية السعودية

اعداد
مدى فيصل عشكان

إشراف
أ.د. ماجدة محمد علي
د. أمل الظبياني

المستخلص

تمثل الاندوفايتس مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تنشئ روابط تكافلية مع النبات، تجعلها قادرة على التكيف مع النبات، من خلال تعزيز قدرة النبات العائل على البقاء ومقاومة الضغوط البيئية والبيولوجية بشكل شامل عن طريق انتاج مركبات نشطة مفيدة بيولوجيًا. في الآونة الأخيرة، أدى الطلب على زيادة الإنتاج الزراعي باستخدام الاندوفايتس كأسمدة حيوية ومبيدات حيوية، إلى تجدد الاهتمام بالعثور على اندوفايتس جديدة لديها القدرة على إنتاج مواد بيولوجية فريدة. تمت دراسة العديد من الأبحاث على نطاق واسع حول التنوع والخصائص المفيدة للاندوفايتس في بيئات نباتية مختلفة. ولكن القليل من الدراسات متوفرة حول التنوع والتفاعل بين مجتمعات الاندوفايتس في النباتات التي تكافح من أجل البقاء في البيئات القاسية. لذلك، ركزت الدراسة الحالية على عزل وتوصيف وتعريف الاندوفايتس من أربعة نباتات مختلفة تنمو في العين الحارة، بمنطقة غميقة في المملكة العربية السعودية. في هذه الدراسة تم عزل ١١٧ بكتيريا اندوفايتس و٥٧ فطر اندوفايتس من أجزاء مختلفة (جذور، سيقان، اوراق) من النباتات: نبات رقيب الشمس (*Heliotropium pterocarpum*) ونبات الداتورة (*Datura innoxia*) ونبات أمانيا (*Ammania baccifera*) ونبات الغاف عسيلي الأزهار (*Prosopis juliflora*). تم اختيار منها ٥٠ عزلة بكتيرية و١٥ عزلة فطرية اعتمادا على الاختلافات المميزة في الصفات الظاهرية (الصفات المورفولجية)، لتعريفها جزيئيا باستخدام التسلسل الجيني (S rDNA١٦) لتعريف البكتيريا و(ITS) لتعريف الفطريات. أظهرت نتائج التحليل الوراثي أن غالبية العزلات البكتيرية تنتمي الى (٥٥ % جاما-برتيوبكتيريا، ١٢ % بيتا-بروتيوبكتيريا، ٨ % ألفا-برتيوبكتيريا، ١٨٪ عصويات بكتيرية، ٤ % اكتينوبكتيريا، و٢ % بكتيرويد). وغالبية العزلات الفطرية تنتمي الى (٩٩ % فطريات زقية، ١ % فطريات بازيدية). من ضمن هذه العزلات، تم اختيار٢٨ نوعًا من البكتيريا و١١ نوعًا من الفطريات، وذلك لفحص قدرتها معمليا في تعزيز نمو النبات والتحكم في النبات ضد مسببات الأمراض. أظهرت النتائج في هذه الدراسة، أن (٢٤ عزلة بكتيرية) قادرة على انتاج الأمونيا. (١٨عزلة بكتيرية و٨ عزلة فطرية) قادرة على استخلاص الفوسفات، بمعدل استخلاص يتراوح (١,٢ إلى ١,٤) للعزلات البكتيرية و (١,٠٤ إلى ١,١٣) للعزلات الفطرية. كما أن (١٧عزلة بكتيرية و٨ عزلة فطرية) قادرة على انتاج حامل الحديد Siderophore لجذب عنصر الحديد من البيئة. بالاضافة الى أن جميع هذه العزلات البكتيرية أثبتت قدرتها على انتاج كميات مختلفة من الهرمونات النباتية، مثل: هرمون الجبريلين بتركيز يتراوح من ٠,٠٠١± ٠,٠٠١ الى ٠,٤٤٥ ± ٠,٠٨ ملجرام/ ملليتر، هرمون الاكسين بتركيز يتراوح من٠,٠٠١± ٠,٠٠١ الى ٠,٠٥٦ ± ٠,٠١ ملجرام/ملليتر. كما أن ٢٢ عزلة بكتيرية قادرة على استخلاص النيتروجين من مادة

(aminocyclopropane-1-carboxylic acid ACC). كمصدر نتيروجيني في بيئة التجربة، هذه العزلات البكتيرية أنتجت أيضا كمية ملحوظة جدا من مادة α-ketobutyrate بنشاط انزيمي يتراوح من٠,٠٠٥±٠,٠٢ الى ٠,١٠٧±٠,٠٢ مليمول/ملجرام/ساعة. خضعت أيضا جميع عزلات الاندوفايتس لاختبار قدرتها على إنتاج المضاد الميكروبي بواسطة قياس قطر منطقة التثبيط ضد أنواع مختارة من البكتيريا الممرضة (*Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*) حيث أظهرت النتائج أن (١١ عزلة بكتيرية و٢ عزلة فطرية) أنتجت نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد واحد على الأقل من هذه البكتيريا المسببة للأمراض. اضافة الى أن جميع عزلات الاندوفايتس أيضا أظهرت قدرتها على انتاج المضاد الفطري بواسطة قياس نسبة التثبيط ضد أنواع مختارة من الفطريات النباتية الممرضة (*Fusarium oxyspourum* و *Talaromyces funiculosus* و *Curvularia khuzestanica* و*Curvularia* sp). كما أظهرت جميع عزلات الاندوفايتس البكتيرية والفطرية قدرتها في انتاج أنشطة أنزيمية مختلفة خارج الخلية، من هذه الأنزيمات cellulase وpectinase وamylase و lipase وchitinase وprotease. من خلال دراسة هذا البحث، تم العثور على ملاحظات مثيرة للاهتمام لكل عزلة من عزلات الاندوفايتس. حيث أن العزلة البكتيرية *Sphingomonas koreensis* المعزولة من نبات *Ammannia baccifera* ونبات *Prosopis juliflora* والعزلة البكتيرية *Kocuria sediminis* المعزولة من نبات *Heliotropium pterocarpum*، تعتبر أنواع جديدة من الاندوفايتس حيث أنه تم عزلها من النباتات في هذا البحث لأول مرة. في الختام، النباتات التي تنمو في ظل ظروف قاسية من المحتمل أن تحتوي على اندوفايتس جديدة وفريدة من نوعها. يمكن أن يكون لهذه الأندوفايتس أنشطة متعددة في تعزيز نمو النبات والتحكم في مسببات الأمراض النباتية من خلال انتاج مركبات جديدة نشطة بيولوجيا. وبالتالي، لابد من الاستمرار في البحث عن بيئات نباتية أخرى فريدة من نوعها في المملكة العربية السعودية لعزل المزيد من الاندوفايتس والحصول على مركبات جديدة نشطة بيولوجيًا يمكن الاستفادة منها في المجال الزراعي والصناعي والبيئي.

Isolation, Characterization and Identification of Endophytes from Some Plants Growing in Hot spring area at Gumiqa in Saudi Arabia

By
Mada Faisal Ashkan

Supervised by:
Prof. Dr. Magda Mohammed Aly
Dr. Amal Yahya Aldhebiani

Endophytes represent a diverse group of microorganisms that make symbiotic associations with plants, these microorganisms supposed to affect the ecology of plants, by frequently enhancing the capacity of the host plant to survive and resist environmental and biological stresses through production of beneficial bioactive compounds. Recently, the demand for increasing the agriculture production by using endophytes as bio-fertilizers and bio-pesticides, have caused a resurgence of interest in finding new endophytes that have the ability to produce unique biological substances products. Several researchers have extensively studied the diversity and beneficial characteristics of endophytes in different plant ecologies. However, a little knowledge is available on diversity, and interaction of endophyte communities in plants struggling for existence in extreme environments. Therefore, the present study was focused on isolation, characterization, and identification of endophytes from four different plants growing at Hot spring, Gumiqa in Saudi Arabia. A total of 117 endophytic bacteria and 57 endophytic fungi were obtained from different organs (leaves, stems, and roots) of four plants *Heliotropium pterocarpum, Datura innoxia***,** *Ammannia baccifera,* and *Prosopis juliflora*. Fifty bacterial and fifteen fungal isolates that exhibited differences in phenotypic aspect were subjected to molecular analysis by using partial 16S rDNA gene sequencing for bacteria and ITS for fungi. The phylogenetic analysis revealed that the majority of endophytic bacterial isolates belonged to γ-protobacteria (55 %), β-protobacteria (12 %), α-protobacteria (8 %), Firmicutes (18 %), Actinobacteria (4 %), and Bacteroidetes (2 %), and the majority of endophytic fungal isolates belonged to Ascomycota (99 %), and Basidomycota (1 %), with various species. Among the endophyte isolates, only 28 bacteria, and 11 fungi were selected for screening of plant growth promotion and controlling plant against pathogens, *in vitro*. Among these isolates, (24 bacterial isolates) produced ammonia, (18 bacterial and 8 fungal isolates) solubilized of phosphate, with solubilizing index ranged (1.2 to 1.4) for the bacterial isolates and (1.04 to1.13) for the fungal isolates, (17 bacterial and 8 fungal isolates) produced siderophore to acquire iron. In addition, the bacterial isolates produced variable amounts of phytohoromnes, such as gibberellic acid (GA) ranged from 0.001±0.001 to 0.445±0.08 mg/ml broth, and indole acetic acid (IAA) ranged from 0.001±0.001 to 0.056±0.01 mg/ml broth. Most of the isolates (22 bacterial isolates) were able to utilize 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) as sole source of nitrogen on experimental plate, these bacterial isolates deaminated ACC and produced a quite appreciable amount of α-ketobutyrate with ACC deminase activity ranged from 0.005±0.02 to 0.107± 0.02 mmol.$mg^{-1}h^{-1}$. Furthermore, the endophytes (11 bacterial and 2 fungal isolates) showed antibacterial activity against at least one of the test human pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli,* and *Pseudomonas aeruginosa*). Also, all the bacterial and fungal isolates exhibited

antifungal activity against at least one of the plant pathogens (*Fusarium oxyspourum, Talaromyces funiculosus, Curvularia khuzestanica,* and *Curvularia* sp.). In addition, all the bacterial and fungal isolates produced different extracellular enzymatic activities, including: cellulase, pectinase, amylase, lipase, chitinase, and protease. In this study, interesting observations were found for each endophyte isolate. The bacterial isolates *Sphingomonas koreensis,* which isolated from *Ammannia baccifera,* and *Prosopis juliflora*, and *Kocuria sediminis,* which isolated from *Heliotropium pterocarpum*, these isolates considered as novel bacterial endophytes. In conclusion, plants growing under extreme conditions harbor a diversity of unique endophytes. These endophytes could be having multiple activities in promoting plant growth and controlling infection against phytopathogens, which lead to be used as biological products for plants. Thus, bioprospecting needs to search for other unique plant ecologies in Saudi Arabia to isolate more novel endophytes with bioactive compounds that can be used in the agricultural, industrial and environmental fields.