Name of Candidate: Essam Mostafa Abd El-Kader **Degree:** Ph.D.

Title of Thesis: Microbial secretions and their applications in agriculture

Department: Agricultural Microbiology

Approval: / /2007

ABSTRACT

The experiments were carried out during the years from 2001 to 2006 at Tissue Culture and Germplasm Conservation Research Lab. Hort. Res. Inst., Agric. Res. Center (ARC), Giza, Egypt, to isolate and identify some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and investigate some factors affecting indole acetic acid (IAA) production. In additions to study the effect of bacterial-IAA on the behaviour of micropropagation stages (i.e., shoot multiplication and rooting stages) of tea tree (*Melaluca lucadendron*) and periwinkle (*Catharansis roseus*) explants *in vitro*. The results obtained from the first experiment showed that 20 rhizobacterial isolates of 137 (the total number of isolated bacteria) were able to produce IAA and five of them were IAA over producers. Three isolates of the five over producers belonged to the genus *Pseudomaonas* and designated as Ps1, Ps2 and Ps3, one isolate belonged to *Klebsiella* and the fifth isolate was belonged to genus *Acinetobacter*. IAA production was associated with the bacterial growth during log and/or stationary phase. Using NFM1 supplemented with malic or fumaric acids as a carbon source, adjusted pH at 6.5-7.0 and incubated at static stat under 30-35 °C considered the most favorable condition for IAA production. IAA production increased with increasing tryptophan added to the medium.

Acenitobacter produced the highest amount of GA3 and 2-iP while Ps2 produced the greatest amount of zeatin in the media.

For the second experiment, results of micrpropagation of *Melaluca lucadendron* cleared that the greatest multiplication rate was recorded as a result of applying MS medium supplemented with BAP at 1.0 mgl^{-1} plus *Acenitobacter*-IAA at 0.2 mgl^{-1}. All treatments of rooting stage resulted in 100% of rooting; the highest average of root number was recorded for the treatment with synthetic-IAA at 1.0 mgl^{-1}, whereas the greatest length and dry weight of roots recorded for the treatment with *Acenitobacter*-IAA at 1.0 mgl^{-1} plus PG at 0.25 mgl^{-1}.

For micropropagation of *Catharanthus roseus*, culturing of explants on MS

S.A. El-Gizawy A.

medium enriched with BAP at 1.0 mgl^{-1} plus *Klebsiella*- IAA at 0.1 mgl^{-1} resulted in the greatest shoot number per explant, while the highest average of shootlet length and leaves number recorded for the treatment of *Acenitobacter*-IAA at 0.1 mgl^{-1}. In rhizogenesis stage, the highest rooting capacity achieved when *Acenitobacter*-IAA at 0.1 mgl^{-1} plus PG at 0.25 mgl^{-1}. The highest number of roots formed per shootlet recorded for treatment with *Pseudomonas* (2)-IAA at 2.0 mgl^{-1} plus PG at 0.5 mgl^{-1}, whereas the highest length of the formed roots and the maximum dry weight observed after treating with synthetic-IAA at 2.0 mgl^{-1} plus PG at 0.5 mgl^{-1} and *Acenitobacter*-IAA at 2.0 mgl^{-1} plus PG at 0.25 mgl^{-1}, respectively.

S. A. El-Gizawy A. Zedan

نموذج (٤)

اسم الطالب: عصام مصطفى عبد القادر **الدرجة:** الدكتوراه

عنوان الرسالة: الإفرازات الميكروبية و تطبيقاتها فى الزراعة.

المشرفون: أ.د./ سمير عبد الواحد الجيزاوي – أ.د. أحمد فاضل الشهابي – أ.د. عصام محمد عبد المنعم يوسف

قسم: الميكروبيولوجيا الزراعية **تاريخ منح الدرجة** / / ٢٠٠٧

المستخلص

أجريت هذه الدراسة خلال الفترة من ٢٠٠١ الى ٢٠٠٦ بمعمل بحوث زراعة الأنسجة و حفظ الأصول الوراثية- معهد بحوث البساتين- مركز البحوث الزراعية- جيزة – مصر و تهدف الى عزل و تعريف بعض عزلات من البكتريا المحفزة لنمو النبات و دراسة العوامل المؤثرة على انتاج هذه البكتريا لإندول حمض الخليك. كذلك تهدف الى دراسة تأثير إندول حمض الخليك المنتج بواسطة البكتيريا على سلوك الإكثار الدقيق لنباتي شجرة الشاى و الونكا بمرحلتيه (مرحلة التضاعف و مرحلة التجذير). و كانت النتائج المتحصل عليها فى تجربة البكتريا هي: تم عزل ١٣٧ عزلة بكتيرية منها ٢٠ عزلة قادرة على انتاج إندول حمض الخليك ، و منها خمس عزلات فقط كانت فائقة الإنتاجية- ثلاث عزلات منها تابعة لجنس سيدوموناس و عزلة تابعة لجنس كليبسيللا و عزلة تابعة لجنس أسنيتوباكتر. و قد لوحظ أن انتاج إندول حمض الخليك كان متزامنا مع نمو البكتريا في الطور الأسي و طور الثبوت. أما بالنسبة للعوامل المؤثرة على انتاج إندول حمض الخليك فقد وجد أن استخدام بيئة NFM1 مضافا اليها حمض الماليك أو الفيوماريك كمصدر وحيد للكربون و كذلك عند درجة حموضة ٦,٥-٧ و التحضين على درجة حرارة ٣٠ – ٣٥م° بدون استخدام هزاز هى الظروف المثلى لإنتاج إندول حمض الخليك. و قد دلت النتائج على أن انتاج إندول حمض الخليك يزداد بزيادة تركيز التربتوفان المضاف الى البيئة. أظهرت النتائج ان العزلة البكتيرية أسنيتوباكتر أنتجت أكبر كمية من حامض الجبرليك و ٢-أيزوبنتينيل أدنين مقارنة بالعزلات الأخرى- بينما عزلة سيدوموناس ٢ أنتجت أكبر كمية من الزياتين.

بالنسبة للجزء الثاني من الدراسة فكانت نتائج الإكثار الدقيق لشجرة الشاى هى أعلا معدل للتضاعف سجل عند الزراعة على بيئة موراشيج و سكوج مضافا اليها بنزيل أمينو بيورين بتركيز ١,٠ ملجم/لتر مع إندول حمض الخليك المنتج بواسطة أسنيتوباكتر بتركيز ٠,٢ ملجم/لتر. وقد أدت جميع معاملات التجذير الى نسبة تجذير ١٠٠% و أدى استخدام إندول حمض الخليك المخلق بتركيز ١,٠ ملجم/لتر الى تكون أكبر عدد من الجذور على الفريعات، أما استخدام إندول حمض الخليك المنتج بواسطة عزلة أسنيتوباكتر بتركيز ١,٠ ملجم/لتر مع فلوروجلوسينول بتركيز ٠,٢٥ ملجم/لتر فقد أدى الى الحصول على أعلى قيمة لطول الجذور و الوزن الجاف للجذور.

فى الإكثار الدقيق لنبات الونكا فقد دلت النتائج على أن استعمال بيئة موراشيج و سكوج مضافا اليها بنزيل أمينوبيورين بتركيز ١,٠ ملجم/لتر مع إندول حمض الخليك المنتج بواسطة عزلة كلبسيللا بتركيز ٠,١ ملجم/لتر أدى الى الحصول على أكبر عدد من الفريعات المتكونة من كل فصلة نباتية بينما أكبر متوسط لطول الفريعات و عدد الأوراق المتكونة على كل فريعة فقد نتج عند زراعة النباتات على بيئة موراشيج و سكوج مضافا اليها إندول حمض الخليك المنتج بواسطة العزلة البكتيرية أسنيتوباكتر بتركيز ٠,١ ملجم/لتر. أوضحت النتائج فى مرحلة التجذير أن استعمال إندول حمض الخليك المنتج بواسطة العزلة البكتيرية أسنيتوباكتر بتركيز ٠,١ ملجم/لتر مع فلوروجلوسينول بتركيز ٠,٢٥ ملجم/لتر أدى الى الحصول على أعلى نسبة تجذير بينما استعمال إندول حمض الخليك المنتج بواسطة عزلة سيدوموناس (٢) بتركيز ٢,٠ ملجم/لتر مع فلوروجلوسينول بتركيز ٠,٥ ملجم/لتر أدى الى تكون أكبر عدد من الجذور على كل فريعة. عند استعمال إندول حمض الخليك الصناعي بتركيز ٢,٠ملجم/لتر مع فلوروجلوسينول بتركيز ٠,٥ ملجم/لتر و إندول حمض الخليك عزلة أسنيتوباكتر بتركيز ٢,٠ ملجم/لتر مع فلوروجلوسينول بتركيز ٠,٢٥ ملجم/لتر أدى الى الحصول على أكبر متوسط لطول و الوزن الجاف للجذور على التوالى.

LIST OF CONTENTS

	Page
1. Introduction	1
2. Review of literature	3
3. Material and methods	33
4. Results and discussions	46
1. First experiment: Indole acetic acid production by rhizobacteria	46
1.1. Isolation of indole acetic acid producing bacteria	46
1.2.Screening of bacterial isolates for IAA production	46
1.1.2. Identification of the over IAA producing rhizobacteria	46
1.2. Determination of growth curve and production curve of different identified rhizobacterial strains grown on three different media.	48
1.3. Factors affecting indole acetic acid (IAA) production in culture media	56
1.4. Detection of phytohormones other than IAA produced by the five selective rhizobacterial strains	66
1.4.1. Detection of gibbrillic acid (GA3) in bacterial culture filtrate	69
1.4.2. Detection of cytokinins in bacterial culture filtrate	69
1.4.2.1. Bacterial production of Zeatin	69
1.4.2.2. Bacterial production of isopentenyladenin (2iP)	69
2. Second experiments: *In vitro* propagation	72
2.1. Micropropagation of *Melaleuca leucadenderon* explants	74
2.1.1. Shootlets multiplication stage	74
2.1.1.1. Effect of individual forms of bacterial-IAA	74
2.1.1.2. Effect of combined forms of bacterial-IAA and cytokinin	78

(BAP)
2.1.1. Rhizogenesis stage 84
2.1.1.1. Effect of individual forms of bacterial-IAA 85
2.1.1.2. Effect of combined forms of bacterial-IAA and phloroglucinol (PG) 87
2.2. Micrpropagation of *Catharanthus roseus* explants 92
2.2.1. Shootlets multiplication stage 93
2.2.1.1. Effect of individual form of bacterial-IAA 93
2.2.1.2. Effect of combined forms of bacterial-IAA and cytokinin (BAP) 97
2.2. Rhizogenesis stage 103
2.2.1. Effect of individual form of bacterial-IAA 105
2.2.2. Effect of combined forms of bacterial-IAA and phloroglucinol (PG) 108
Conclussion 112
Summary 118
References 127
Arabic summary

LIST OF APPREVIATIONS

BAP	6-Benzyl amino purin
IBA	Indole-3-buteric acid
IAA	Indole-3-acetic acid
NAA	Naphthaline acetic acid
Kin	Kinetin
GA_3	Gibberellic acid
MS	Murashige and Skoog medium (1962)
2iP	2-isopentenyl adenine
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
NFM1	N-free medium 1
NFM2	N-free medium 2
SEM	Soil extract medium
HPLC	High performance liquid chromatography
PG	Phloroglucinol