توصيف عزلات محلية من البكتريا التكافلية لنبات الحمص المزروع في محافظة السويداء وتقييم كفاءتها في تثبيت الآزوت الجوي

روان هيا الخطيب* محمود أبو غرة** محمد سعيد الشاطر***

(الإيداع:1 تموز 2019 ،القبول: 22 آيلول 2019)

الملخص:

هدف هذا البحث إلى عزل الريزوبيا من نبات الحمص وتوصيفها بيوكيميائياً وتقييم كفاءتها في تثبيت الآزوت الجوي، نُفِّذ البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة بجامعة دمشق في البيت الزجاجي التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية، ضمن أصص بلاستيكية في الموسم الزراعي 2017 . 2018 م جمعت عينات نباتية من نبات الحمص من مواقع مختلفة من محافظة السويداء بسورية. عزل منها 124 عزلة بكتيرية. تبين نتيجة العدوى الاصطناعية أن 46 عزلة منها شكلت عقداً جذرية، وبنتيجة الاختبارات الكيميائية الحيوية تبيّن أنها تنتمي لعائلة الرايزوبيا، كانت سالبة غرام و غير متبوغة وموجبة الكاتلاز و سالبة الاوكسيداز وقادرة على استخدام بعض السكريات كالزيلوز و المالتوز و الفركتوز و الغالاكتوز والسكروز والمانيتول كمصدر للكربون. كما أنها تستقلب الغلوكوز وغير قادرة على استقلاب اللاكتوز. بعض هذه العزلات تحلل النشاء وبعضها الآخر تحلل الجيلاتين.

بينت نتائج تقدير الآزوت الكلي في النبات باستخدام جهاز كلداهل أن هناك فروقاً معنوية في كمية الآزوت المثبتة حيوياً بين النباتات الملقحة بالبكتيريا والشاهد غير الملقح، حيث بلغت كمية الآزوت الكلي في الشاهد **0.01 غ/ نبات**. بينما كانت عند النباتات الملقحة بالبكتريا أعلى من قيمة معاملة الشاهد.

من جهة أخرى تبين أن هناك فروقاً معنوية فيما بين العزلات بقدرتها على تثبيت الآزوت الجوي في النبات، وقد تراوحت كمية الأزوت المثبت ما بين **0.055 غ/نبات** للعزلة **r10.2** المأخوذة من شهبا . العجيلات و **0.011 غ/نبات** للعزلة **r27.2.2** المأخوذة من شهبا . عزران.

كلمات مفتاحية: حمص . رايزوبيا . اختبارات بيوكيميائية . آزوت

*طالبة دكتوراه . قسم علوم التربة، كلية الزراعة، جامعة دمشق

** أستاذ دكتور. قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة

***أستاذ دكتور. قسم علوم التربة، كلية الزراعة، جامعة دمشق

Characterization of local isolates of chickpea symbiotic bacteria grown in AS- Swaida governorate and evaluation of their efficiency in atmospheric Nitrogen Fixation

Rawan Haya Al Khateeb* **Dr. Mahmoud Abu Gharraa**** **Dr. Mohammed Said AlShater*****

(Received: 1 Jule 2019, Accepted: 22 September 2019)

Abstract:

The aim of this study was: Isolate Rhizobia from the chickpea plant, determine its biochemical characters and evaluate its efficiency in fixing atmospheric nitrogen. The research was carried out in the laboratory of bacterial plant diseases in the Faculty of Agriculture-Damascus and in the glass house of the National Commission of Biotechnology for the agricultural season 2017 2018. Plant samples were collected from different locations of AS-Swaida governorate, Syria. 120 bacterial strains were isolated, the result of artificial infection showed that 46 isolates formed root nodes. The biochemical tests showed that they belong to the family of Rizobia, Where They was Gram negative, Do not form spores, catalase positive, oxidase negative, able to use some sugars such as xylose, maltose, fructose, galactose, sucrose and mannitol as the source of carbon. they also metabolizes glucose and they are unable to metabolize lactose. some isolates decompose starch and others dissolve gelatin. Estimating the total nitrogen in the plant using Kaldahl method showed that there were significant differences in the quantity of fixing nitrogen between bacterial and non bacterial treated plants. The total nitrogen content in the control was 0.01 g / plant. While the plants were inoculated Bacteria are higher than the value of the control. On the other hand, There were also significant differences among isolates in their ability to fix the atmospheric nitrogen, whereas The amount of nitrogen was ranged between 0.055 – 0.011 g / plant for isolates r10.2 from Shahba - Al Ojailat and r 27.2.2 from Shahba – Ezran respectively.

Keywords: Chickpea plant ,Rhizobia, biochemical tests, Azot.

---

*(PhD) student, Soil Sciences Dep., Damascus Univ.

** Professor, Plant Damascus Univ

*** Professor, Soil Science Dep., Damascus Univ.

1- مقدمة:

يعتبر الحمص من المحاصيل البقولية ذات القيمة الغذائية العالية لما يحتويه من عناصر غذائية إذ يحتوي على: بروتين 18-22% وألياف 7-13% ونشويات 47-57% وماء 9.5-10% ورماد3.5-4% ومواد أخرى 4-5.4%. كما أنه يحتوي على سكريات ومواد معدنية عديدة كالنحاس واليود وبعض الأحماض الأمينية الضرورية لجسم الإنسان كحمض الأوكساليك والماليك وبعض الفيتامينات مثل (أ –ب–ج). ونظراً لارتفاع قيمته الغذائية ورخص ثمنه مقارنة مع أسعار اللحوم بات يعتبر الغذاء الشعبي الأول بالنسبة لكثير من الناس في سورية والوطن العربي وبعض دول آسيا وافريقيا. ومن هنا نبعت أهميته كمحصول اقتصادي (منشورات وزارة الزراعة والاصلاح الزراعي، 1996). وباعتبار الحمص من النباتات البقولية فإن له أثراً كبيراً في زيادة خصوبة التربة وتحسين نمو المحاصيل الحقلية وذلك عبر دخوله في معيشة تكافلية (تبادلية المنفعة) مع البكتريا التي تعيش داخل العقد الجذرية حيث يمد النبات البكتريا العقدية بما تحتاجه من المواد العضوية وغير العضوية اللازمة لها، بينما تمد البكتريا النبات بالمواد الآزوتية وذلك بتثبيتها لآزوت الهواء الجوي في النبات(Peoples وزملاؤه، 1995؛ Sprent وزملاؤه، 2017؛ Andrews و Andrews ، 2017).

يعتبر عنصر الأزوت كما أشار Lebedev وزملاؤه (2017) من العناصر الغذائية الهامة لنمو النباتات حيث يدخل في تكوين الأحماض الأمينية التي يتكون منها البروتين، وفي تكوين النيوكليتيدات واليخضور والفيتامينات والأنزيمات ومنظمات النمو والأحماض النووية ومشتقات الأمينات كالكولين وفي بناء الأغشية الخلوية. وهو المكون الأساسي للمادة الحية، كما هو ضروري لعملية التنفس، ويلعب دوراً هاماً في الإثمار وتكوين الجذور. وتعد نسبة الآزوت والكربوهيدرات بأنسجة النبات ذات اهمية كبرى حيث يتوقف عليها مدى اتجاه النبات نحو النمو الخضري أو الثمري وهو ما يعبر عنه بنسبة C/N ratio (فولى، 2006). يتم تثبيت الآزوت حيوياً **Bio-nitrogen fixation** (BNF) بواسطة مجموعة محددة من بدائيات النوى، تستخدم هذه الكائنات إنزيمًا يسمى النيتروجيناز لتحفيز تحول الآزوت في الغلاف الجوي (N2) إلى الأمونيا ($NH4^+$) ، وهو شكل الآزوت الذي يمكن تمثيله بواسطة النبات(Franche وزملاؤه، 2009).

يعتبر التسميد الحيوي بالبكتريا المثبتة للأزوت الجوي من الطرائق الطبيعية لزيادة محتوى التربة من الأزوت، وتحقيق احتياجات المحاصيل من هذا العنصر الغذائي، وبالتالي ديمومة الأنظمة الزراعية(Papastylianou و Danso، 1991) ومن العوامل التي تؤثر على تثبيت الآزوت تكافلياً:

عوامل تتعلق بالتربة: فعموماً كل ما يناسب نمو النبات البقولي من تهوية وحرارة ورطوبة وملوحة ورقم حموضة بالطبع يساعد على تكوين العقد الجذرية، وتثبيت الآزوت، ويزيد من المقدرة على تثبيت الآزوت.

فمثلا pH قريب من التعادل يناسب تكوين العقد الجذرية، كما أن الريزوبيا حساسة للجفاف والملوحة والحرارة المرتفعة والرطوبة الزائدة والغمر الذي يؤدي إلى نقص الأكسجين كما في الأراضي الغدقة. كما أنها حساسة لبعض الآفات ويرقات الحشرات والبكتريوفاج (Traas وزملاؤه، 1998.)

أيضاً وجود أو إضافة المركبات الكيميائية مثل K, P, Mn, Ca ينشط تكوين العقد الجذرية وبالتالي يزيد من عملية التثبيت فالكلسيوم يساعد الريزوبيا على اختراق الشعيرة الجذرية لأنه يدخل في نشاط الإنزيم المحلل للبكتين. ووجود المنجنيز يساعد على الاستفادة من الكلسيوم. كما أن الفوسفات تزيد من قدرة الميكروبات على التثبيت أما البوتاسيوم يزيد من عملية التثبيت لقدرته على التأثير في زيادة الكربوهيدرات في النبات. المولبيدنيوم هام حيث يدخل في تركيب إنزيم النتروجيناز. وكذلك الكوبالت فهو يدخل في تركيب مساعدات الإنزيمات (كردعلي، 2001).

أما فيما يخص مستوي الآزوت المعدني (أمونيا ونترات)، فوجود مستوي عال منهما يجعل النبات يحصل على الأزوت ويمثله، مع حدوث تناقص واضح في أعداد وأحجام العقد، فالمستوى المنخفض منهما يشجع عملية التثبيت(Kurdali، 1997).

. عوامل تتعلق بالنبات والبكتريا العقدية: ومنها سلالة البكتريا(اختلاف السلالات) (Herridge وزملاؤه، 2008).

حيث وجد مثلاً عند عزل 100 سلالة من ريزوبيا البرسيم في حقول مختلفة، أن هذه السلالات تختلف في قدرتها على تثبيت الآزوت الجوي على صنف واحد من البرسيم . حيث وجد أنه من أصل 100 سلالة كانت 25 سلالة لها قدرة عالية على التثبيت، 50 لها قدرة متوسطة بينما 25 سلالة لها قدرة ضعيفة وتدعى سلالات غير فعالة(Udvardi و Poole، 2013؛ Clarke وزملاؤه، 2014).

ومن أهم الأحياء الدقيقة المستخدمة لإنتاج اللقاح أو السماد الحيوي الآزوتي: **الريزوبيا** (*Rhizobia*) التي تنتمي تصنيفياً لعائلة *Rhizobiaceae*، و أهم الأجناس التي تضمها: (*Braydyrhizobium* – *Azorhizobium* – *Rhizobium* – *Sinorhizobium* – *Nerorhizobium* – *Pararhizobium* – *Ensifer*– *Mesorhizobium* – *Allorhizobium*) (Jarvis وزملاؤه، 1997 ؛ De Lajudie وزملاؤه،[a] 1998 ؛ Masson–Biovin وزملاؤه، 2009 ؛ Young وزملاؤه، 2001؛ Mousavi وزملاؤه، 2014؛ Mousavi وزملاؤه، 2015).

تزيد الريزوبيا من إنتاج النباتات البقولية من 10 . 35%، حيث تتراوح كميات الآزوت المثبتة بين 50 و200 كغ/ هـ، تسهم مخلفاتها النباتية في إمداد المحاصيل اللاحقة بالآزوت (Danso و Papastylianou ، 1992؛ Herridge وزملاؤه، 2008). حيث ذكر El– Hadi و El–Sheikh (1999) بأن التلقيح بالريزوبيا أدى إلى زيادة كبيرة في إجمالي عدد العقد الجذرية في النبات ، ووزن 100 بذرة ، وإنتاجية المحصول من الحبوب (70–72%) ومحتوى حبوب الحمص من البروتين. كما أن تلقيح البذور زاد محصول الحمص من الحبوب وحسن النوعية بنسبة 50 % بالإضافة الى زيادة مسطح الورقة والمادة الجافة للنبات (Pepol وزملاؤه، 2018).

كما لخص Keyser وزملاؤه (1993) أهم الصفات الواجب توافرها في السلالة البكتيرية المستخدمة كلقاح حيوي بالنقاط التالية: القدرة على تثبيت الآزوت الجوي ضمن مجال واسع من الظروف البيئية ومنافسة السلالات الأخرى والتكاثر في البيئة والبقاء في المادة الحاملة والبقاء عند دمجها في مواد مغلفة للبذور والانتشار والبقاء في التربة بعيداً عن تأثير جذور النبات العائل وتشكيل العقد الجذرية وتثبيت الآزوت الجوي بوجود أزوت التربة ومجابهة العوامل البيئية غير المناسبة وخاصة الفيزيائية منها كالجفاف ودرجة الحرارة المرتفعة والتجمد وأخيراً الثباتية الوراثية.

2–أهداف البحث:

1. عزل سلالات محلية من البكتريا التكافلية لنبات الحمص في مواقع عديدة من محافظة السويداء، ومعرفة السلالات القادرة على تشكيل عقد جذرية بنتيجة العدوى الاصطناعية.
2. توصيف العزلات البكتيرية بالاختبارات البيو كيميائية (الكيمياحيوية).
3. تقييم كفاءة العزلات المحلية في تثبيت الآزوت الجوي.
4. انتخاب أفضل عشر سلالات بكتيرية كخطوة أساسية في إعداد لقاح بكتيري يستعمل كسماد حيوي.

3–مواد وطرائق البحث:

تم تنفيذ البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية في جامعة دمشق، وفي البيت الزجاجي التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية للموسم الزراعي 2017 . 2018 م.

3-1- جمع العينات النباتية:

جمعت عينات عشوائية من نبات الحمص بعمر 6 . 8 أسابيع بين شهري أيار وحزيران لعام 2017 م من عدة مواقع في محافظة السويداء المزروعة بالصنف **(العجيلاتي)**، بمعدل أربعة نباتات من كل حقل، ووضعت العينات في أكياس بلاستيكية مع بطاقة تحتوي على رقم العينة ومنطقة الجمع وتاريخ أخذ العينة، وتم نقلها إلى مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة بدمشق .

3-2- عزل البكتريا:

تم فصل الجذر عن المجموع الخضري، غسلت الجذور من التراب تحت الماء الجاري وتمت عملية تعقيم الجذر الحامل للعقد الجذرية بالكحول الإيتلي 70%، فصلت العقد الجذرية بمشرط معقم ووضعت في جفنة معقمة وأضيف اليها هيبو كلوريد الصوديوم 2% مدة دقيقتين ثم الغسل والنقع بالماء المقطر دقيقتين ثلاث مرات، وضعت العقد المعقمة في جفنة معقمة وأضيف اليها 2 مل ماء معقم وتم الطحن ثم تركت العقد المطحونة بماء الطحن 5 دقائق ، ثم أخذ 60 ميكرولتر من ماء الطحن ونشر على طبق يحوي وسط مستخلص الخميرة والمانيتول yeast manitol agar (YMA)(مانيتول 1%، آغار 1.5%، خميرة 0.1% ، فسفات ثنائية البوتاسيوم 0.08%، كلور الصوديوم 0.01% ، كربونات الكلسيوم 0.1% ، ماءات المغنزيوم المائية 0.02%) (أبو غرة، 1997)، حضنت الأطباق على درجة حرارة 28 مْ لمدة 48 ساعة.

نقلت مستعمرات منفردة إلى أطباق جديدة وحضنت بنفس الشروط السابقة وأعطي لكل واحدة رمزاً ثم حفظت البكتريا في وسط LP (ببتون: 7غ/ لتر، خميرة: 7غ/ لتر) مع غليسرول ضمن أنابيب Oppendort 1.5 مل عند درجة حرارة 20- لإجراء الاختبارات عليها في وقت لاحق.

3-3- تعريف البكتريا المعزولة باستخدام العدوى الاصطناعية والطرائق الكيميا حيوية والدراسة المجهرية:

3-3-1- العدوى الاصطناعية:

تمت العدوى ضمن أصص بمعدل ثلاث مكررات للعزلة لتقييم كفاءة العزلات البكتيرية في تشكيل العقد الجذرية على جذور الحمص . عقم الخفان الزراعي في الأتوكلاف مرتين لمدة 20 دقيقة عند الحرارة 121 درجة مئوية، ووزع ضمن الأصص المعقمة .

. وضع 10 مل من بيئة سائلة LP (ببتون:7 غ/لتر وخميرة : 7غ/ لتر) ضمن أنابيب زجاجية وعقمت بالأتوكلاف لمدة 20 دقيقة على حرارة 121 مْ ، تركت لتبرد ثم لقحت ب 1 مل من معلقات بكتيرية محضرة من العزلات المراد اختبارها، وتم التحضين عند درجة حرارة 28 مع الرج 100 دورة/ دقيقة لمدة 48 ساعة بغرض نقع بذور الحمص المعقمة بها لمدة ساعة قبل زراعتها.

. زرعت أصص تحتوي الخفان المعقم والمسقي بالماء حتى السعة الحقلية.

. بعد الإنبات تم سقاية النبات بمحلول مغذي من العناصر المغذية باستثناء الأزوت (**Fe: 11 كغ /هكتار، Mn: 10 كغ /هكتار ، Zn: 2 كغ /هكتار ،Cu : 2 كغ /هكتار ، K_2O: 20 كغ /هكتار ، P_2O_5: 38 كغ /هكتار**)(أبو نقطة والشاطر، 2010).

قلعت النباتات بعد 8 أسابيع من الزراعة وسجل وجود أو غياب العقد على جذورها(Laranjo وزملاؤه، 2014).

3-3-2- تعريف البكتريا بالطرائق الكيميائية الحيوية والدراسة المجهرية:

أجريت الاختبارات الكيميا حيوية لتعريف البكتريا وهي: اختبار غرام بطريقة (Suslow وزملاؤه، 1982)، اختبار الكاتالاز(Goszczynska وزملاؤه، 2000) ، واستقلاب لاكتوز(De oliveira وزملاؤه، 2007)، واختبار الأوكسيداز واختبار غلوكوز ببتون أغار وتحلل الجيلاتين بطريقة Frasier واختبار أكسدة السكريات والتبوغ وتحلل النشاء والتنفس و الصبغ و تراكم حبيبات poly-B- hydroxybutyrate وكافة الاختبارات بغرض الدراسة المجهرية (في أبو غرة، 1997).

3-4- تقدير الآزوت الكلي في النبات بطريقة كلداهل: تم حساب كمية الآزوت الكلي في النبات بالغرام بعد ضرب النسبة المئوية للأزوت الكلي بالوزن الجاف في كل نبات (أبو نقطة والشاطر، 2010).

3-5- التحليل الإحصائي:

. أجري التحليل الإحصائي بأخذ المتوسط الحسابي لثلاث مكررات تجريبية وتحليل البيانات باستخدام MSTAT-C واعتماداً على اختبار دونكان عند مستوى معنوية 0.05.

4-النتائج والمناقشة:

4-1- عزل البكتريا والعدوى الاصطناعية (تقييم كفاءة العزلات البكتيرية في تشكيل العقد):

الجدول رقم (1): التوزع الجغرافي للعزلات المدروسة

اسم العزلة	منطقة الجمع
r31.2،r24.1 -r31.1	شهبا . شقا
r26.3.1،r26.1	صلخد . عيون
r27.2.2. r27.1.1،r27.3	شهبا . عزران
r28.1.2.	شهبا . حديقة منزلية
r29.1.1	شهبا . ابو الريش و الوردة
r32.2،r32.1	شهبا . بارك
r33.3.2،r33.3.1،r33.1 . r33.3.4،r33.3.3	صلخد . القريا
r8.2.1	السويداء. رساس
r38.1.1	السويداء. العين
r39.1	السويدا. نمرة القريا
r42.1	السويداء. العفينة
r19.4 -r19.1	شهبا . المشنف
r44.3.1. r44.2،r18.1 . r44.3.2	شهبا . نمرة
،r45A.A.2.2،r45A.1-r10.2	شهبا. العجيلات
r46.2.2،r46.1-r17.3.1	شهبا . ام رواق
r47.1- r12.2-r12.1	شهبا. طربا
r48.1.1	شهبا. رضيمة الشرقية
r49.2.2،r20.2-r20.1 . r49A.2 ،r49A.1	شهبا. الجنينة
r2. 3	شهبا . دوما
r3.2.1 ،r3.1	شهبا . تيما
r16.2	السويداء. ذيبين

يعد نبات الحمص عالي التخصص في العلاقة التعايشية مع الرايزوبيا ، حيث تستعمر جذوره أنواع قليلة منها(Broughton و Petter، 1999؛ Laranjo وزملاؤه، 2008) ، تم عزل 124 عزلة بكتيرية من العقد البكتيرية على جذور الحمص. تبين بنتيجة العدوى الصناعية أن 46 عزلة بكتيرية قادرة على التعقد حيث أظهرت النتائج أن العزلات جدول رقم (1) شكلت عقد جذرية في حين أن باقي العزلات لم تشكل عقد وهذا يتوافق مع(كردعلي، 2001) حيث أن سبب عدم تعقد بعض العزلات قد يكون عائداً إلى عدم انتماء البكتريا إلى الريزوبيا (تلوث) أو ربما ضعف كفاءة البكتريا أو عدم قدرتها على التأقلم مع الظروف البيئية. وقد تشكل العدد الأكبر من العقد الجذرية (وردية اللون) على طول الجذر الرئيسي قرب منطقة التاج الجذري وهذا يتوافق مع دراسة (Jakobsen، 1985 ؛ Andrews وAndrews ، 2017).

4-2- تعريف البكتريا:

تم اختبار ال 46 عزلة التي شكلت عقداً جذرية على جذور نبات الحمص بناءً على نتائج العدوى الاصطناعية حيث أظهرت النتائج:

4-2-1- مجهرياً: وحيدة الخلية ، عصوية الشكل ، أبعادها أقل من 2 ميكرون، بعضها متحرك بسوط قطبي والبعض الآخر متحرك بسياط محيطية، غير متبوغة ، تراكم حبيبات poly-B- hydroxybutyrate ، سالبة غرام وهذا يتوافق مع (Holt وزملاؤه، 1994).

4-2-2- الخواص المزرعية:

أظهرت نتائج العزل على الوسط الانتخابي YMA بعد 48 ساعة من التحضين مستعمرات كريمية اللون ، دائرية الشكل ، تامة الحواف، ومخاطية وهذا يتوافق مع الصفات الشكلية (المورفولوجية) للرايزوبيا (Holt وزملاؤه، 1994).

4-2-3-الخواص البيوكيميائية (الكيمياحيوية):

بينت الاختبارات الكيمياحيوية (الجدول رقم (2)) أن كافة العزلات السابقة سالبة غرام و موجبة الكاتلاز وسالبة الاوكسيداز و قادرة على استخدام بعض السكريات كالزيلوز و المالتوز و الفركتوز والغالاكتوز والسكروز والمانيتول كمصدر الكربون وهذه النتائج تتوافق مع صفات الرايزوبيا التي ذكرها Deora وزملاؤه (2010) و Bano و Erum (2008) و Kanika وزملاؤه (2010) و/ Teng وزملاؤه (2015)، كما أنها تستقلب الغلوكوز وغير قادرة على استقلاب اللاكتوز وهذا يتوافق مع ما توصل إليه (Oliveira وزملاؤه، 1997)، جميع العزلات غير متبوغة وذات تأكسد هوائي وهذا يتوافق مع (Rosenberg وزملاؤه، 2014). كما تميزت العزلات r10.2 و r44.2 وr31.2 و r48.1.1 و r3.2.1 و r44.3.1 و r49A.2 و r16.2 و r17.3.1 بقدرتها على تحليل النشاء والعزلات r10.2 و r31.1 و r24.1 وr19.1 و r39.1 و r12.1 و r45A.A.2.2 و r12.2 و r46.1 وr31.2 و r20.2 و r29.1.1 و r3.1 و r47.1 و r20.1 وr32.2 و r19.4 و r33.3.2 و r26.1 و r3.2.1 و r32.1 وr44.3.1 و r38.1.1 و r33.3.1 و r44.3.2 و r42.1 و r27.3 وr8.2.1 و r16.2 و r33.3.3 و r46.2.2 و r49A.1 و r18.1 و r33.1 و r28.1.2 و r17.3.1 وr27.2.2 بتحليلها الجيلاتين.

الجدول رقم (2): الخصائص الكيميائية الحيوية للعزلات المدروسة

اسم العزلة	غرام	كاتالاز	أوكسيداز	تحليل جيلاتين	تحليل نشاء	استقلاب لاكتوز	أكسدة مجموعة سكريات *	استقلاب غلكوز	التنفس
r10.2, r31.2, r3.2.1, r44.3.1, r16.2, r17.3.1	.	+	.	+	+	.	+	+	تأكسد هوائي
r31.1, r24.1, r19.1, r39.1, r12.1, r45A.A.2.2, r12.2, r46.1, r20.2, r29.1.1, r3.1, r47.1, r20.1, r32.2, r19.4, r33.3.2, r26.1, r32.1, r38.1.1, r33.3.1, r44.3.2, r42.1, r27.3, r8.2.1, r33.3.3, r46.2.2, r49A.1, r18.1 r33.1, r28.1.2, r27.2.2	.	+	.	+	.	.	+	+	تأكسد هوائي
r33.3.4, r45A.1, r27.1.1, r2.3, r49.2.2, r26.3.1	.	+	.	.	.	.	+	+	تأكسد هوائي
r44.2, r48.1.1, r49A.2	.	+	.	.	+	.	+	+	تأكسد هوائي

*مجموعة السكريات هي (الزيلوز ، المالتوز ، الفركتوز ، الغالاكتوز ، السكروز ،المانيتول)

4-3- تقييم كفاءة العزلات في التثبيت الحيوي للآزوت الجوي:

زراعة بذور الحمص في أصص تحتوي مادة خاملة لا تحوي عناصر مغذية أتاح إضافة كافة العناصر الغذائية التي يحتاجها النبات باستثناء الآزوت "الخفان المعقم" (وبذلك تكون كمية الآزوت الكلي المقدرة في النبات تعكس الآزوت المثبت حيوياً)(كردعلي، 2001). بينت نتائج تقدير الآزوت الكلي في النبات الجدول رقم (3) أن هناك فروق معنوية في كمية الآزوت المثبتة حيوياً بين النباتات الملقحة بالبكتيريا والشاهد غير المعامل، حيث بلغت كمية الآزوت الكلي في الشاهد**0.01 غ/ نبات** بينما كانت عند النباتات المعاملة بالبكتريا أعلى من قيمة معاملة الشاهد.

الجدول رقم (3) كمية الآزوت الكلي في نبات الحمص المعامل ببكتريا الريزوبيا (غ/ نبات)

اسم العزلة	كمية الآزوت الكلي (غ/نبات)	اسم العزلة	كمية الآزوت الكلي (غ/نبات)	اسم العزلة	كمية الآزوت الكلي (غ/نبات)
r10.2	0.055^{a}	r2.3	0.03^{eo}	r44.3.2	0.023^{hr}
r31.1	0.053^{ab}	r3.1	0.03^{eo}	r42.1	0.023^{hr}
r24.1	0.051^{ac}	r49.2.2	0.028^{ep}	r27.3	0.023^{hr}
r19.1	0.047^{ad}	r47.1	0.028^{ep}	r49A.2	0.019^{jr}
r39.1	0.044^{ae}	r20.1	0.029^{ep}	r8.2.1	0.018^{kp}
r33.3.1	0.041^{af}	r48.1	0.028^{ep}	r16.2	0.018^{kp}
r44.2	0.039^{ag}	r32.2	0.029^{ep}	r33.3.3	0.017^{lr}
r12.1	0.038^{bh}	r19.4	0.027^{fp}	r46.2.2	0.016^{mr}
r45A.A.2.2	0.037^{ci}	r33.3.2	0.027^{fq}	r49A.1	0.016^{nr}
r45A.1	0.035^{ci}	r26.1	0.027^{fq}	r18.1	0.014^{or}
r12.2	0.034^{dg}	r3.2.1	0.025^{fr}	r33.1	0.014^{or}
r46.1	0.034^{dj}	r32.1	0.025^{fr}	r28.1.2	0.013^{pr}
r31.2	0.033^{dk}	r44.3.1	0.025^{fr}	r17.3.1	0.013^{pr}
r27.1.1	0.033^{dl}	r38.1.1	0.025^{fr}	r27.2.2	0.011^{qr}
r20.2	0.032^{dm}	r26.3.1	0.024^{gr}	شاهد سلبي	0.01^{r}
r29.1.1	0.031^{dn}	r33.3.4	0.022^{hr}	LSD	0.01

عدم وجود أحرف مشتركة يعني وجود فرق معنوي على مستوى معنوية 0.05، الحرفان غير المتتاليان يعني المجال بين الحرف الأول والأخير (Duncan، 1995)

كما تبين أن هناك فروق معنوية فيما بين العزلات بقدرتها على تثبيت الآزوت الجوي في النبات، وقد تراوحت كمية الأزوت المثبت حيوياً بين **0.055 غ/نبات** للعزلة **r10.2** و **0.011 غ/نبات** للعزلة **r27.2.2**، وكانت العشر سلالات الأكثر كفاءة في تثبيتها للآزوت الجوي: r10.2 ، r31.1، r24.1، r19.1، r39.1 ، r33.3.1، r44.2، r12.1

r45A.1، r45AA.2.2، حيث بلغت كمية الآزوت المثبت حيوياً 0.055 ، 0.053 ، 0.051 ، 0.047، 0.044 ، 0.041 ،0.039، 0.038، 0.037، 0.035 غ/ نبات على التوالي. وهذا يتوافق مع (Laranjo وزملاؤه، 2014) و (Dwivedi وزملاؤه ، 2015) بأن نبات الحمص متخصص في العلاقة التعايشية مع الرايزوبيا، وأن العديد من بكتيريا الرايزوبيا يمكن أن تشكل عقداً فعالة في تثبيت الآزوت الجوي على جذوره. وكانت العقد الجذرية المتشكلة عليها وردية وفيرة وكبيرة و حمراء من الداخل و النباتات قوية ولونهاأخضر وهذا بحسب (Motsara وزملاؤه، 1995؛ Andrews وزملاؤه، 2013) دليل على فعالية عالية للبكتيريا.

5- الاستنتاجات والتوصيات:

5. 1- الاستنتاجات:

1. تم الحصول على عزلات نقية، تتبع عائلة الرايزوبيا بناءً على صفاتها الكيميائية الحيوية، متعايشة مع جذور نبات الحمص و قادرة على تشكيل عقد جذرية .

2. تم تقييم كفاءة العزلات في تثبيت الآزوت الجوي وكانت العزلة(**r10.2** المأخوذة من شهبا . العجيلات) هي الأكثر كفاءة في تثبيت الأزوت الجوي أما العزلة الأقل كفاءة فقد كانت **(r27.2.2** المأخوذة من شهبا . عزران). وانتخبت 10 عزلات الأفضل في تثبيت الأزوت الجوي، لاستكمال التجارب المخبرية والحقلية عليها وذلك لإعداد سماد حيوي فعال في تثبيت الأزوت الجوي.

5. 2- التوصيات:

1. متابعة الاختبارات الحقلية لمعرفة سلوك العزلات في التربة وقدرتها على التنافس مع أحياء التربة ومواءمتها للشروط البيئة الحقلية.

2. التعريف الجزيئي لهذه العزلات وغيرها اللاتي أثبتت فاعليتها في تثبيت الآزوت الجوي كونه السبيل الأكيد لتحديد الجنس والنوع.

3. إمكانية الاستفادة من نتائج البحث من أجل انشاء مشروع اقتصادي لإنتاج لقاحات بكتيرية فعالة تحقق ريعية جيدة للمؤسسة التي ستتبنى المشروع.

4. إجراء دراسات مماثلة على عزلات من مختلف المناطق في سورية.

6- المراجع:

1. أبو غرة، محمود . (1997). أمراض النبات البكتيرية (النظري والعملي). دمشق: منشورات جامعة دمشق، ص: 350-359.

2. أبو نقطة، فلاح و الشاطر، محمد سعيد . (2010). خصوبة التربة والتسميد (الجزء النظري). دمشق: منشورات جامعة دمشق، ص: 316.

3. فولى، حسن محمود. (2006). تأثير وأهمية التسميد الآزوتي والفوسفاتي و البوتاسي. الاسكندرية: منشورات نقابة المهن الزراعية، ص: 11.

4. كرد علي، فواز. (2010). التثبيت الحيوي للأزوت الجوي. دمشق: منشورات هيئة الطاقة الذرية السورية، ص: 132.

5. منشورات وزارة الزراعة والاصلاح الزراعي. (1996). دمشق: وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.

1- Andrews, M., Raven, J. A., and Lea, P. J., (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. Ann. Appl. Biol., 163: 174–199.

2- Andrews, M., and Andrews, M. E., (2017) Specificity in legume-rhizobia symbioses. Int. J. Mol. Sci., 18: 705.

3- Broughton, W. J., and Perret, X., (1999). Genealogy of legume- Rhizobium symbioses. Current Opinion in Plant Biology, 2: 305-311.

4- Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Day, D. A., and Smith, P. M. C., (2014). Transport processes of the legume symbiosome membrane. Front. Plant Sci., 5: 699.

5- Danso, S.K., and Papastylianou, I., (1992). Evaluation of The Nitrogen Contribution of legumes to subsequent cereals . J. Agric. sci. Cambridge, 119: 13-18.

6- De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. et al., (1998[a]). Allorhizobium undicola gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate Neptunia natans in Senegal. International Journal of Systematic Bacteriology, 48 (4): 1277-1290.

7- De Oliveira, A. N., De Oliveira, L. A., Andrade, J. S., and Chagas, J. A. F., (2007). Rhizobia amylase production using various starchy substances as carbon substrates .Brazilian Journal of Microbiology, 38: 208-216.

8- Deora, G.S., and Singhal, K., (2010). Isolation, biochemical characterization and preparation of bio fertilizers using Rhizobium strains for commercial use. Bioscience Biotechnology research Communications, 3 (2): 132-136.

9- Duncan, D. B., (1995). Multiple rang and multiple F test. . Biometrics, 11: 1-53.

10- Dwivedi, S. L., Sahrarwat, K. L., Upadhyaya, H. D., Mengoni, A., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Biondi, E. G., Hungria, M., Kaschuk, G., Blair, M.W., and Ortiz, R., (2015). Chapter one-advances in host plant and rhizobium genomics to enhance symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. Advances in Agronomy, 129: 1-116.

11- El-Hadi, E.A. and E.A.E. El-Sheikh .1999. Effect of Rhizobium inoculation and nitrogen fertilization on yield and protein contents of six chickpea (Cicer arietinum L.) cultivars in marginal soils under irrigation nutrient cycling in agro ecosystem. 54(1): 57-63. (C.F. Sammaries of Monograph, Record 1779 of 210- CAB Abstr. 1998-2000.

12- Erum, Sh., and Bano, A., (2008). Variation in phytohormone production in Rhizobium Strains at Different Altitudes of Northern Areas of Pakistan. International journal of agriculture and biology Pakistan, 10(5): 536-540.

13- Franche, C., Lindstrom, K., and Elmerich, C., (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil, 32(1): 35-59.

14- Goszczynska, T., Serfontein, J. J., and Serfontein, S., (2000). Introduction to practical phytobacteriology (A manual for phytobacteriology), first edition. Safrient- loop of bionet-international c/o ARC – plant protection research institute. Pretoria, p: 83.

15- Herridge, D. F., Peoples, M. B., and Boddey, R. M., (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil, 311: 1–18.

16- Holt, J. G., Kreig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams. S. T., (1994). Berge's Manual of Determinative Bacteriology. 9th. ed., Williams and Wilknis, Baltimore, U.S.A, p: 40-169.

17- Jakobsen. I., (1985). The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plans (Pisum sativum). Physiol. Plant, 64: 190-196.

18- Jarvis, B., Berkum, V.P., Chen, W., Nour, S., Fernandez, M., Cleyet-Marel, J., and Gills, M., (1997). Transfer of Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri, Rhizobium mediterraneum, and Rhizobium tianshanense to Mesorhizobium gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 47(3): 895-898.

19- Kanika, M., Dogra, T., and Nain, L., (2010). Biochemical and Molecular Characterization of Mesorhizobium ciceri Containing acdS Gene. J. Plant Biochemistry & Biotechnology India, 19 (1): 107-110.

20- Keyser, H. H., Somasegaran, P., and Bohlool, B. B., (1993). Rhizobial ecology and technology. In: soil microbial ecology , application in agricultural and environmental management blain Metting. F, Jr.(ed.). Marcel Dekker Inc., p: 205-225.

21- Kurdali, F., Khalifa, K., and Shamma, M., (1997). Cultivar difference in nitrogen association , partitioning and mobilization in rain-fed grown lentil. Field Crops Research, 54: 235-243.

22- Laranjo, M., Alexandre, A., Velazques, E., Young, J. P. W., and Oliveire, S., (2008). Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple Mesorhizobium species. FEMS Microbiology Ecology Oxford, 66 (1): 391-400.

23- Laranjo, M., Alexandre, A., and Oliveira, S., (2014). Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the Mesorhizobium genus. Microbiol Res., 169 (1): 2-17.

24- Lebedev, V. G., Kovalenko, N. P., and Shestlbratov, K. A., (2017). Influence of Nitrogen Availability on Growth of Two Transgenic Birch Species Carrying the Pine GS1a Gene. Plants (Basel), 6 (1): 4-19.

25- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., and Batut, J., (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?. Trends in microbiology, 17 (10): 458-466.

26- Motsara, M. R., Bhattacharya, P., and Srivastava, B., (1995). Biofertilizer Technology, Marketing and usage. FCDO puplisher, New Delhi, p: 183.

27- Mousavi, S.A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., De Lajudie, P., and Lindstrom, K., (2014). Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–

Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. Systematic and applied microbiology, 37 (3): 208-215.

28- Mousavi, S.A., Willems, A., Nesme, X., De Lajudie, P. and Lindstrom, K., (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov., and 13 new species combinations. Systematic and applied microbiology, 38 (2): 84-90.

29- Oliveira, A., Ferreira, E. M., and Pampulha, M. E., (1997). Nitrogen Fixation , nodulation and yield of clover plants co-inoculated with root –colonizing bacteria. Symbioses, 23: 35-42.

30- Papastylianou, I., and Danso, S. K. A., (1991). Nitrogen Fixation and transfer in vetch and vetch- oats mixture . Soil Biol Bioch. Plant and Soil, 114 (23): 447-452.

31- Peoples, M. B., Herridge, D. F., and Ladha, J. K., (1995). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production?. Plant and soil, 174 (1-2): 3-28.

32- Poole, P., Ramachandran, V., and Terpolilli, J., (2018). Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. Nat. Rev. Microbiol, 16: 291–303.

33- Rosenberg, E., Delong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F., (2014). The Prokaryotes. 4th ed., Springer-Verlag, Berlin.

34- Sprent, J. I., Ardley, J., and James, E. K., (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. New Phytol, 215: 40–56.

35- Suslow, T.V., Schroth, M. N., and Isaka, M., (1982). Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria without Staining, Phytopathology Magazine. U.S.A., 72 (3): 917-918.

36- Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z., and Luo, Y., (2015). Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. Frontiers in plant science. 6(32).

37- Traas, J., Hulskamp, M., Gendreau, E., and Hofte, H., (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing?. Current opinion in plant biology, 1(6): 498-503.

38- Udvardi, M., and Poole, P. S., (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. Annu. Rev. Plant Biol, 64: 781–805.

39- Young, J. M, Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., and Sawada, H., (2001). Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. Vitis. International journal of systematic and Evaluationary Microbiology, 51: 89-103.