عزل البكتيريا المثبتة للآزوت الجوي من نبات الحمص وتوصيفها بيوكيميائياً وجزيئياً

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

(الإيداع: 21 آب 2020 ، القبول: 27 تشرين الأول 2020)

الملخص:

هدف البحث إلى عزل وتوصيف الريزوبيا المثبتة للآزوت من العقد الجذرية في جذور الحمص باستخدام المنهجيات الكيميا حيوية والجزيئية، نفذ البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة بجامعة دمشق وفي البيت الزجاجي التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية ضمن أصص بلاستيكية للموسم الزراعي 2019 . 2020 م. تم جمع عينات نباتية من مواقع مختلفة بمحافظة السويداء، سورية. تم الحصول على 40 عزلة، وزراعة بذور الحمص الملقحة بهذه العزلات في أصص تحتوي وسط خالٍ من الآزوت، أظهرت النتائج أن 26 عزلة فقط شكلت عقداً جذرية. أشارت الاختبارات البيوكيميائية إلى أن البكتيريا المعزولة تنتمي إلى عائلة *Rizobiaceae* (على سبيل المثال، سالبة غرام وغير متبوغة وسالبة الأوكسيداز وموجبة الكاتلاز)، وقادرة على استخدام السكريات (مثل الزيلوز، المالتوز، الفركتوز، الغالاكتوز، السكروز والمانيتول) كمصدر للكربون. أيضاً، تستقلب الغلوكوز ولا تستقلب اللاكتوز. تحلل بعض العزلات النشا والبعض الآخر تحلل الجيلاتين، من ناحية أخرى، أظهرت الاختبارات الجزيئية أنه من بين الـ 26 عزلة كانت 23 عزلة تنتمي إلى جنس *Mesorhizobium*.

الكلمات المفتاحية: حمص . رايزوبيا . اختبارات مجهرية ومزرعية للرايزوبيا. اختبارات بيوكيميائية للرايزوبيا . اختبارات جزيئية للرايزوبيا.

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

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

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

isolate and characterize the N 2 -fixing rhizobia from chickpea root nodules biochemically and molecularly

Rawan Haya Al Khateeb*Dr. Mahmoud Abu GharraaDr. Mohammed Said Al-Shater*****

(Received: 21 August 2020, Accepted: 27 October 2020)

Abstract:

The aim of this study was : isolate and characterize the N 2 -fixing rhizobia from chickpea root nodules using biochemical and molecular methodologies. 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 2019-2020. plant samples were collected from different locations of AS-Swaida governorate, Syria. A total of 40 isolates were obtained. Inoculated Chickpea seedlings with the previous rhizobial isolates were grown in pots containing N-free medium. Results showed that Only 26 isolates formed root nodules . The biochemical tests indicated that the isolated bacteria belong to the family of Rizobiaceae (gram, spore and oxidase negatives and catalase positive), and they were able to use sugars (e.g., xylose, maltose, fructose, galactose, sucrose and mannitol) as sources of carbon. Also, they metabolizes glucose but not lactose. Some isolates decompose starch and others dissolve gelatin. On the other hand, the molecular tests showed that, of 26 isolates 23 isolates were belonged to Mesorhizoium genus

Keywords: Chickpea plant ,Rhizobia, Microscopic and cultural tests of Rhizobia, biochemical tests of Rhizobia, molecular tests of Rhizobia.

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

** Professor, Plant Protection Dep., Damascus Univ.

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

1–مقدمة:

تعد البقوليات (Fabaceae) ثالث أكبر عائلة من النباتات مغطاة البذور حيث تضم 750 جنس و حوالي 19500 نوع (The Legume Phylogeny Working Group، 2013)، كما أن للبقوليات أثراً كبيراً في خصوبة التربة وتحسين نمو المحاصيل الحقلية، فحوالي 90% من الأنواع الموجودة في العائلة البقولية يمكنها تثبيت الآزوت الجوي تكافلياً مع بكتريا تتبع عائلة *Rizobiaceae* داخل العقد الجذرية تسمي بالبكتريا العقدية (Rascio و La Rocca، 2013). حيث تعيش هذه البكتريا مع النباتات البقولية معيشة تكافلية (تبادل المنفعة)، فالنبات يمد البكتريا بما يحتاجه من المواد العضوية كالكربوهيدرات، وغير العضوية اللازمة له. بينما تمد البكتريا النبات بالمواد الآزوتية وذلك بتثبيتها لآزوت الهواء الجوي في النبات(Andrews و Andrews، 2017؛ Sprent وزملاؤه، 2017).

الريزوبيا *Rhizobia* هي بكتريا سالبة الغرام، وحيدة الخلية، حجم الخلية أقل من 2 ميكرون. أهم الأجناس التي تضمها: – *Azorhizobium* – *Rhizobium*) *Braydyrhizobium* – *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).

يتم تصنيف جينات تكوين العقد في ثلاث فئات: (1) جينات nodABC الشائعة والتي تعتبر ضرورية لتشكيل العقد وتؤدي طفرات هذه الجينات إلى نمط ظاهري للعقدة وهذه الجينات موجودة عند جميع أجناس وأنواع الرايزوبيا، والمورثات المتخصصة المميزة لكل نوع بكتيري تلعب دوراً في تحديد العائل النباتي (Guerts و Bisselling، 2002). كما توجد هذه المورثات على البلاسميد باستثناء الجنسين *Bradyrhizobium* و*Mesorhizobium* حيث توجد على الصبغي (Long، 2001؛ Laranjo وزملاؤه، 2008) ؛ (2) جينات معينة (nodEF، nodH، nodG، nodPQ ... الخ) التي تحدد مجموعة كبيرة من microsymbionts وتحدد معدل وتيرة تشكيل العقد الجذرية؛ (3) أسرة جينات nodD (Maj وزملاؤه، 2010). تفرز البقوليات المختلفة أنواعًا مختلفة من الإشارات، والريزوبيا لديها تراكيب مختلفة من بروتينات nodDs الحساسة للتعرف على إشارات إفراز الجذر. ترتبط بروتينات nodDs بالمحفزات الأكثر حفظًا في البكتيريا (وتسمى nodboxes) وتحث على التعبير عن عدة جينات (Downie، 2010).

مورثات nif المسؤولة عن تثبيت الآزوت: تحمل هذه المورثات على البلاسميد باستثناء الجنسين *Bradyrhizobium* و*Mesorhizobium* حيث تكون محمولة على الصبغي (Shamseldin، 2013). وتتميز هذه المورثات بتباين التتالي النكليوتيدي على عكس مورثات الـ nod العامة (Laguerre وزملاؤه، 2001).

يشمل جنس *Mesorhizobium* الأنواع التي يتم توزيعها على نطاق واسع جغرافيا وقادرة على تشكيل العقد على جذور مجموعة واسعة من البقوليات ذات الأهمية الاقتصادية، أهمها الحمص (Chen وزملاؤه، 1991؛ Nour وزملاؤه، 1994). من وجهة نظر تصنيفية ينتمي جنس *Mesorhizobium* إلى صف *Alphaproteobacteria*، ترتيب Rhizobiales. تُشتق البادئة "meso" من الموضع النسبي الوسيط ل *Mesorhizobium* بين مجمع *Agrobacterium–Rhizobium–Ensifer*، وبين أجناس *Azorhizobium* و*Bradyrhizobium* (Jarvis وزملاؤه، 1997). تم اقتراح اسم *Mesorhizobium* في الأصل بواسطة (Jarvis وزملاؤه، 1997) لخمسة أنواع من الريزوبيا (*M. loti*، *M. huakuii* والمعزول من Astragalus sinicus والذي يشكل عقداً جذرية على أنواع أخرى، *M. ciceri*، *M. mediterraneum* و *M. tianshanense*) (Laranjo وزملاؤه، 2014). في الوقت الحاضر، يتكون جنس Mesorhizobium من 41 نوعاً معزولاً من الأنواع النباتية المختلفة الموجودة في مناطق جغرافية مختلفة على هذا الكوكب.

2– أهمية البحث:

فرضت الظروف الاستثنائية التي تمر بها سورية، وصعوبة نقل الأسمدة الآزوتية واستعمالها لطرائق غير شرعية. إضافة الى غلاء أسعارها، وبالتالي ارتفاع تكاليف الإنتاج ضرورة التفكير بعزل عزلات محلية ذات كفاءة عالية على تشكيل العقد الجذرية لاختبار قدرتها لاحقاً على تثبيت الآزوت الجوي حقلياً ومواءمتها للظروف البيئية كخطوة أساسية في إعداد سماد حيوي، كوسيلة مستدامة للمحافظة على خصوبة التربة وترشيد استخدام المواد الكيميائية للوصول إلى زراعة نظيفة.

3–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 المجهرية والمزرعية والبيو كيميائية (الكيمياحيوية).
3. تعريف العزلات البكتيرية بالاختبارات الجزيئية.

4–مواد وطرائق البحث:

تم تنفيذ البحث في مخبر أمراض النبات البكتيرية في جامعة دمشق، وفي البيت الزجاجي التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية للموسم الزراعي 2019 . 2020 م.

4–1– جمع العينات النباتية:

جمعت عينات عشوائية من نبات الحمص بعمر 6 . 8 أسابيع خلال شهر حزيران لعام 2019 م من عدة مواقع في محافظة السويداء المزروعة بالصنف **(العجيلاتي)**، بمعدل أربعة نباتات من كل حقل، وضعت العينات في أكياس بلاستيكية مع بطاقة تحتوي على رقم العينة . منطقة الجمع . تاريخ أخذ العينة، وتم نقلها إلى مخبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الزراعة بدمشق .

4–2– 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 مقطر 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 و72 ساعة. نقلت مستعمرات منفردة إلى أطباق جديدة وحضنت بنفس الشروط السابقة وأعطي لكل واحدة رمزاً يميزها ثم حفظت البكتريا في وسط LP (ببتون: 7غ/ لتر، خميرة: 7غ/ لتر) مع غليسرول ضمن أنابيب Oppendort 1.5 مل تحت درجة حرارة 20– درجة مئوية لإجراء الاختبارات عليها في وقت لاحق.

4–3– تعريف البكتريا المعزولة باستخدام العدوى الاصطناعية والطرائق المجهرية والمزرعية والكيمياحيوية والطرائق الجزيئية:

4–3–1– 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. قلعت النباتات بعد 8 أسابيع من الزراعة وسجل وجود أو غياب العقد على جذورها(Laranjo وزملاؤه، 2014).

4–3–2– تعريف البكتريا بالطرائق المجهرية والمزرعية والكيميائية الحيوية: 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 وتحلل النشاء والتنفس وكافة الاختبارات بغرض **الدراسة المجهرية** كالصبغ وشكل الخلية والتبوغ و**الدراسة المزرعية** كشكل المستعمرة وقوامها ولونها وحوافها(في أبو غرة، 1997).

4–3–3– تعريف البكتريا بالطرائق الجزيئية: أجري تعريف البكتريا جزيئياً باستعمال تقانة colony– PCR على 26 عزلة بكتيرية شكلت عقداً جذرية بناءً على نتائج العدوى الاصطناعية للكشف عن مورثات التعايش (nod A و nod D) باستعمال بادئات جدول (1) للكشف عن مورثة المسؤولة عن تكوين العقد الجذرية عند بكتريا الريزوبيا وبادئات nif H.

متخصصة بالجنس *Mesorhizobium* درست نظرياً باستعمال برنامج primer Blast وقورنت بالمعلومات المخزنة في بنك المعلومات لبكتريا الريزوبيا على الموقع NCBI.

الجدول رقم (1) :البادئات المستخدمة لتعريف البكتريا جزيئياً.

المورثة	التسلسل النكليوتيدي للبادئات	درجة الحرارة tm	حجم المنتج bp	المرجع
Nod A	For 5'– TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA–3' Rev 5'–GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA–3'	55	666	(Belal وزملاؤه، 2013)
Nod D	For5'– CTCTCAGACTTCATGGCACT–3' Rev5'–ACGACGTACAACTTTCCATCT–3'	55	625	(Haukka وزملاؤه، 1998)
Nif H	For 5'–GTCTCCTATGACGTGCT–3' Rev 5'–GCTTCCATGGTGATCGGGGT–3'	55	428	(Belal وزملاؤه، 2013)

أجري تفاعل الـ PCR (25µl حجم نهائي) باستعمال Master Mix 2X (promega) (12.5 µl) و12.5 p mol من البادئ المباشر FOR [10 µM]، و12.5 p mol من البادئ غير المباشر REV [10 µM]، و5 ميكروليتر من معلق بكتيري 107cfu. مل$^{-1}$ وأكمل الحجم بالماء المقطر المعقم إلى حجم التفاعل النهائي.

وأجري تفاعل PCR باستعمال جهاز المدور الحراري (TECHNE TC–4000) أو ما يسمى **تفاعل البلمرة التتابعي (Polymerase Chain Reaction)** وهو تقنية حيوية لحفظ المعلومات الوراثية باستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي ومضاعفة إنتاجها لكي يتسنى إجراء الاختبارات عليها، حيث يتطلب إنتاج الحمض النووي (DNA) بواسطة PCR مايلي:

1. جهاز للتحكم بدرجات حرارة التفاعل بشكل دقيق ومتتالي (الدورة الحرارية Thermocycle): ويقوم هذا الجهاز بتغير درجة الحرارة بشكل سريع، لأن تغير درجة الحرارة هو الأساس الذي تقوم عليه فكرة هذه التقنية.
2. البوليمريز: يقوم الإنزيم ببناء وترتيب القواعد الآزوتية (وحدات الحمض النووي (DNA)، ويجب أن يكون هذا الإنزيم مقاوم للحرارة العالية ليتمكن من العمل.

3. مجموعة متفرقة من القواعد الآزوتية (A T C G): ليتمكن الإنزيم من ترتيبها في مواقعها أثناء عملية نسخ الحمض النووي (DNA).
4. برايمر Primer (البادئ): وهو قطعة صغيرة من الحمض النووي (DNA)، ليتمكن الإنزيم من بدء البناء والنسخ عليها.
5. نسخة من الحمض النووي (DNA) المراد مضاعفته.
6. محلول أو وسط ليتم به التفاعل: يختلف المحلول بين تفاعل وأخر (Qiu وآخرون، 2015).

وفقاً للبرنامج التالي: 5 دقائق على درجة حرارة 94 C^0 لتكسير الخلايا البكتيرية وفصل سلسلتي الـ DNA تلي بـ40 دورة (94C^0 لمدة دقيقة، 55 C^0 بحسب البادئات المستخدمة لمدة دقيقة، 72C^0 لمدة دقيقة) ثم 10 دقائق على درجة حرارة 72C^0 كمرحلة أخيرة لاستكمال الاستطالة.

بعد إتمام برنامج الـ PCR لدوراته تم الكشف عن نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي بتطبيق 100 فولط على هلامة الاغاروز Agarose 1% المضاف لها ايتيديوم بروماید وباستعمال محلول منظم للرحلان 1X TBE(108 =10X TBEغ Tris base، 55غ boric acid، 9.3غ 1.1Mm EDTA ل ماء مقطر$^{-1}$) بالمقارنة مع مؤشر الوزن الجزيئي 50 bp (Fermentas, GeneRulerTM) وتم إظهار الحزم بالتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) بوساطة جهاز توثيق الهلامات VILBER (LourMa) Gel documentation system.

الشكل رقم (1): جهاز المدور الحراري PCR(TECHNE TC–4000)

الشكل رقم (2): الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1%

الشكل رقم (3) جهاز توثيق الهلامات VILBER (LourMa) Gel documentation system

5–النتائج والمناقشة:

5–1– تعريف البكتريا المعزولة باستخدام العدوى الاصطناعية والطرائق الكيمياحيوية:

5–1–1–العدوى الاصطناعية :

يعد نبات الحمص عالي التخصص في العلاقة التعايشية مع بكتريا الرايزوبيا ، حيث تستعمر جذوره أنواع قليلة منها(Broughton و Petter، 1999؛ Laranjo وزملاؤه، 2008) ، تم عزل 40 عزلة بكتيرية من العقد البكتيرية على جذور الحمص من مواقع مختلفة من محافظة السويداء. تبين بنتيجة العدوى الصناعية أن 26 عزلة بكتيرية قادرة على التعقد (شكلت عقد جذرية) في حين أن باقي العزلات لم تشكل عقداً وهذا يتوافق مع(Pepol وزملاؤه، 2018) حيث أن سبب عدم تعقد بعض العزلات قد يكون عائداً إلى عدم انتماء البكتريا إلى الريزوبيا (تلوث) أو لمجموعة التلقيح التبادلي التي يتبع لها الحمص أو ربما ضعف كفاءة البكتريا أو عدم قدرتها على التأقلم مع الظروف البيئية أو إصابتها بالفاجات. وقد تشكل العدد الأكبر من العقد الجذرية (وردية اللون) على طول الجذر الرئيسي قرب منطقة التاج الجذري وهذا يتوافق مع دراسة (Jakobsen، 1985 ؛ Andrews و Andrews ، 2017).

الجدول رقم (1): التوزع الجغرافي للعزلات

اسم العزلة	منطقة الجمع
r24.1 –r31.1 –. r31.2	شهبا . شقا
r26.1.	صلخد . عيون
– r27.1.1 . r27.2.2	شهبا . عزران
r29.1.1	شهبا . ابو الريش و الوردة
r32.1	شهبا . بارك
r33.3.1	السويداء . القريا
r8.2.1	السويداء. رساس
r39.1	السويدا. نمرة القريا
r42.1	السويداء. العفينة
r19.4 –r19.1	شهبا . المشنف
r44.2	شهبا . نمرة
r45A.1–r10.2.	شهبا. العجيلات
r46.1–r17.3.1.	شهبا . ام رواق
r12.2–r12.1	شهبا. طربا
r20.2–r20.1. r49A.1– r49A.2–	شهبا. الجنينة
r16.2	السويداء. ذيبين

5–1–2–تعريف البكتريا بالطرائق المجهرية والمزرعية والكيمياحيوية :

تم اختبار الـ 26 عزلة التي شكلت عقداً جذرية على جذور نبات الحمص بناءً على نتائج العدوى الاصطناعية حيث 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) لبكتريا الرايزوبيا (Holt وزملاؤه، 1994). إلى جانب ذلك تبين في الدراسة المجهرية أنها وحيدة الخلية، عصوية الشكل، أبعادها أقل من 2 ميكرون، غير متبوغة، سالبة غرام وهذا يتوافق مع (Holt وآخرون، 1994). بينت الاختبارات الكيمياحيوية (الجدول رقم (2)) أن كافة العزلات السابقة موجبة الكاتلاز، سالبة الاوكسيداز، قادرة على استخدام بعض السكريات كالزيلوز و المالتوز و الفركتوز ، الغالاكتوز والسكروز والمانيتول كمصدر الكربون وهذه النتائج تتوافق مع صفات الرايزوبيا التي ذكرها Deora وزملاؤه (2010) و Erum و Bano (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 ذات تأكسد هوائي وهذا يتوافق مع (Rosenberg وزملاؤه، 2014). كما تميزت العزلات r10.2, r31.2, r16.2, r17.3.1, r44.2, r49A.2بقدرتها على تحليل النشاء والعزلات r10.2, r31.2, r16.2, r17.3.1, r31.1, r24.1, r19.1, r39.1, r12.1, r12.2, r46.1, r20.2, r29.1.1, r20.1, r19.4, r26.1, r32.1, r33.3.1, r42.1, r8.2.1, r49A.1, r27.2.2 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, r16.2, r17.3.1	.	+	.	+	+	.	+	+	تأكسد هوائي
r31.1, r24.1, r19.1, r39.1, r12.1, r12.2, r46.1, r20.2, r29.1.1, r20.1, r19.4, r26.1, r32.1, r33.3.1, r42.1, r8.2.1, r49A.1, r27.2.2	.	+	.	+	.	.	+	+	تأكسد هوائي
r45A.1, r27.1.1,	.	+	.	.	.	.	+	+	تأكسد هوائي
r44.2, r49A.2	.	+	.	.	+	.	+	+	تأكسد هوائي

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

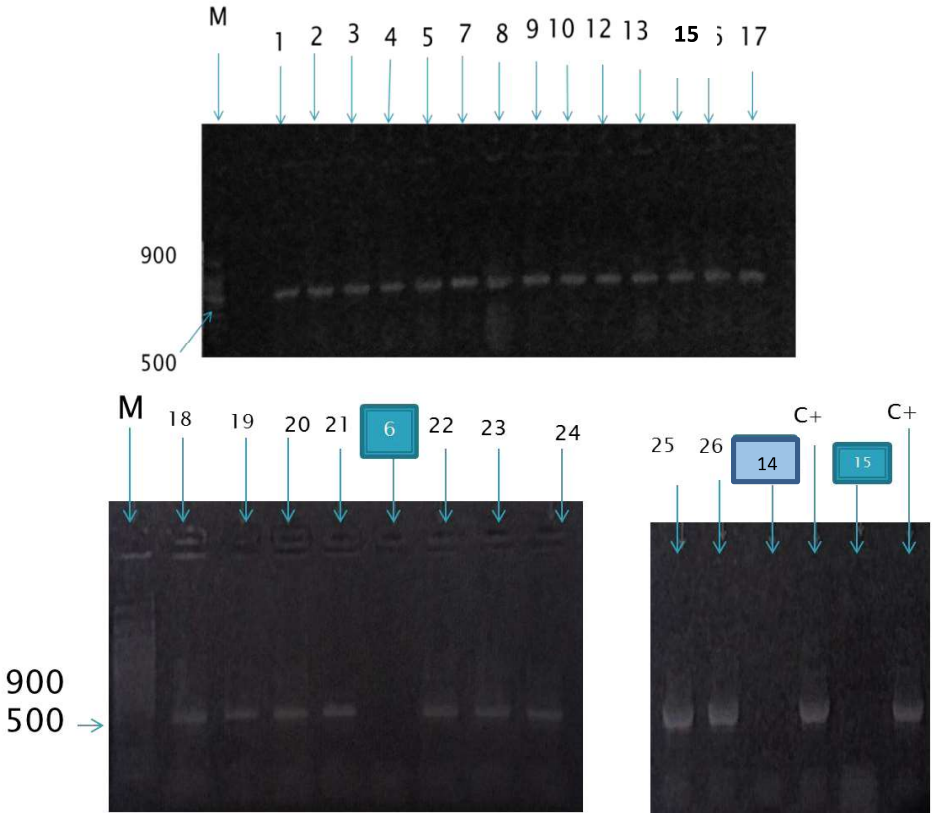
5-1-3- اختبارات تعريف البكتريا بالطرائق الجزيئية:

أجري اختبار Colony-PCR على 26 عزلة بكتيرية للكشف عن مورثات التعايش (nod و nif) عوضاً عن تطبيق تقانة PCR على الـ DNA النقي، تفادياً لفقد البلاسميد خلال استخلاص الـ DNA لأن معظم تقانات الاستخلاص تسمح باستخلاص الكروموزوم مفرداً أو البلاسميد مفرداً، كما تعد أقل تكلفة وأسرع في العمل. اختبرت العزلات البكتيرية (r10.2 وr44.2 و r31.2 وr49A.2 وr16.2 وr31.1 وr24.1 وr19.1 وr39.1 وr12.1 وr12.2 وr46.1 وr20.2 وr29.1.1 وr20.1 وr19.4 وr26.1 وr32.1 وr33.3.1 وr42.1 وr8.2.1 وr49A.1 وr17.3.1 وr27.2.2 و r27.1.1وr45A.1)، كما تم استخدام أزواج بادئات متخصصة بالمورثات nodA وnodD تسمح بالكشف عن مورثات التعايش العامة عند مختلف أجناس الريزوبيا حيث يعطي زوج البادئات nodA قطعة بوزن جزيئي 666 bp، وزوج البادئات nod قطعة بوزن جزيئي 625 bp.

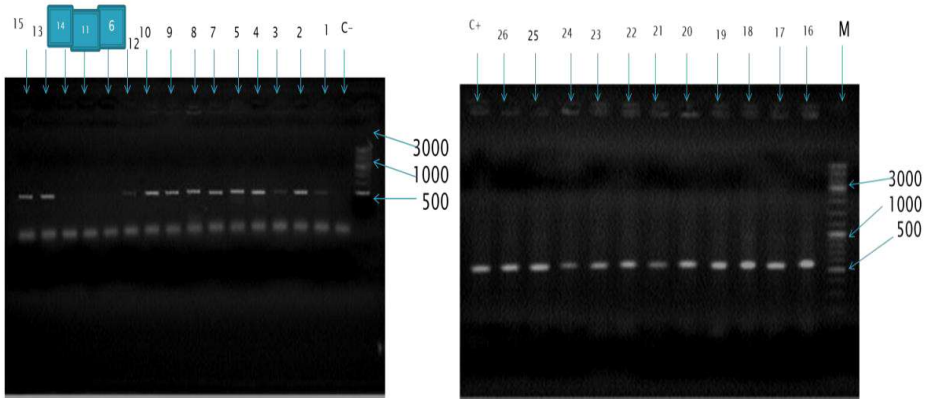
أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي، باستعمال زوج البادئات nodA وnodD مع شاهد سلبي (عزلة تم الحصول عليها من خلال الدراسة ولم توافق مواصفات الريزوبيا) وشاهد ايجابي (عزلتين مأخوذتين من الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق)، ظهور حزمة بوزن 666 bp عند استخدام زوج البادئات nodA وحزمة بوزن 625 bp باستخدام زوج البادئات nodD عند الشاهد الايجابي وعند كافة العزلات المختبرة (والموافقة للرايزوبيا بناءً على اختبارات العدوى الصناعية والكيميا حيوية السابقة)

باستثناء العزلات (r32.1 و r26.1 و r12.2) والشاهد السلبي، وقد يكون السبب فقدها للقدرة على التعايش والفعالية التكافلية نتيجة تكرار زرعها على الوسط المغذي (Smith و Bidochka، 1998) أو أنها تعرضت لطفرة (Heldmaire و Werner، 2003) الشكل (4) و(5). وحيث أن العزلات (r10.2 و r44.2 و r31.2 و r49A.2 و r16.2 و r31.1 و r24.1 و r19.1 و r39.1 و r12.1 و r46.1 و r20.2 و r29.1.1 و r20.1 و r19.4 و r42.1 و r33.3.1 و r8.2.1 و r49A.1 و r17.3.1 و r27.2.2 و r27.1.1 و r45A.1) أعطت الحزمة المتوقعة عند استخدام زوج البادئات nodA و nodD. وتوافقت النتائج الجزيئية مع النتائج الكيمياحيوية والعدوى الصناعية فهذا يؤكد انتمائها للريزوبيا وهذا يتوافق مع (Haukka وزملاؤه، 1998؛ Heldmaire و Werner، 2003).

ولتمييز، فيما اذا كانت العزلات السابقة تنتمي إلى جنس *Rhizobium* أو *Mesorhizobium* أو غيره، فقد تم استخدام البادئات المتخصصة بمورثة nifH عند جنس *Mesorhizobium* وقد اختبر تخصص البادئ عبر تحليل معلوماتي حيوي الشكل (6) باستعمال برنامج Primer Blast على موقع NCBI، وشمل الاختبار مقارنة زوج البادئات مقابل كل ما يحويه بنك المعلومات من سلاسل نكليوتيدية لجميع الكائنات الحية (nr) لغاية شهر تموز 2019. أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز ظهور حزمة بوزن 428 bp من المورثة السابقة عند الشاهد الإيجابي والعزلات (r10.2 و r44.2 و r31.2 و r49A.2 و r16.2 و r31.1 و r24.1 و r19.1 و r39.1 و r12.1 و r46.1 و r20.2 و r29.1.1 و r20.1 و r19.4 و r42.1 و r33.3.1 و r8.2.1 و r49A.1 و r17.3.1 و r27.2.2 و r27.1.1 و r45A.1) كافة، الشكل (7) وهذا يؤكد احتوائها على مورثة nif H التي تشفر بروتين الحديد في أنزيم النتروجيناز (عن كرد علي، 2001) وانتمائها لجنس الـ *Mesorhizobim* وهذا يتوافق مع (Maâtallah وزملاؤه، 2002؛ Laranjo وزملاؤه، 2008؛ Belal وزملاؤه، 2013) حيث يعد الحمص متخصص بالعلاقة التعايشية مع الريزوبيا وأن العديد من بكتريا *Mesorhizobim* يمكن أن تشكل عقد جذرية فعالة على جذوره. وانتماء العزلات السابقة لجنس الـ *Mesorhizobim* فهذا يعني أنها قد تنتمي لأحد الأنواع (*M. ciceri*، *M. mediterraneum*، *M. tianshanense*، *M.loti*، *M. amorphae*) (Nour وزملاؤه، 1994؛ كردعلي، 2001)، كما لوحظ غياب الحزمة المتوقعة باستخدام زوج البادئات nif H في العزلات (r32.1 و r26.1 و r12.2) اللاتي لم تعط نتيجة إيجابية في اختبارات التعايش.

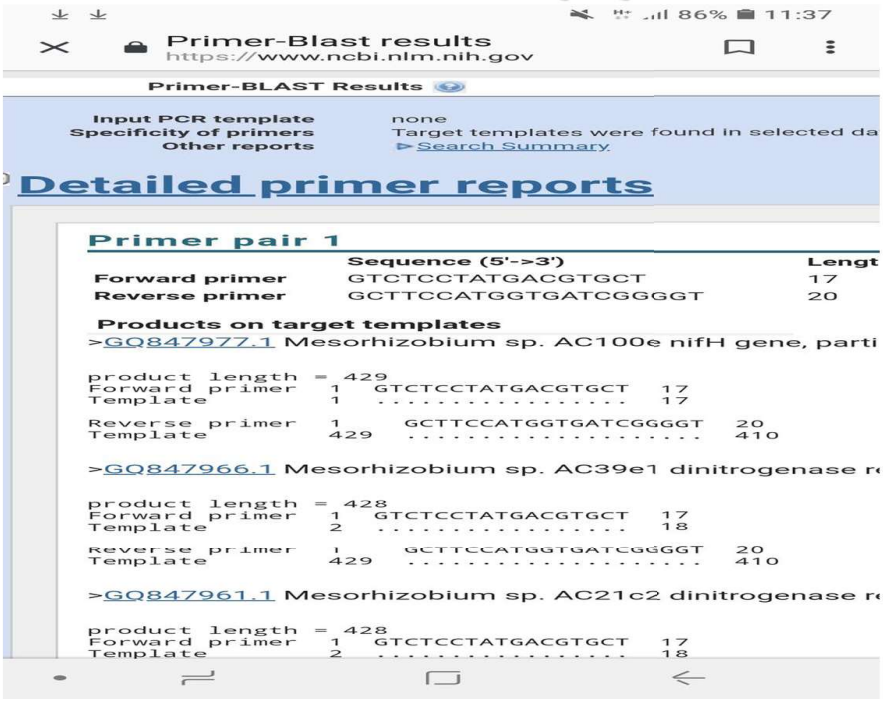


الشكل رقم (4): الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR باستخدام زوج البادئات nodA حيث (1= r10.2, 2= r31.1, 3=r24.1, 4=r19.1, 5= r39.1, 6=r12.2, 7= r33.3.1, 8= r44.2, 9= r12.1, 10= r45A.1, 11= r26.1, 12=r46.1, 13= r31.2, 14=r32.1, 15= r27.1.1, 16=r29.1.1, 17= r20.2, 18= r20.1, 19= r19.4, 20= r42.1, 21= r49A.2, 22=r8.2.1, 23= r16.2, 24= r49A.1, 25= r17.3.1, 26= r27.2.2 شاهد سلبي=–C, شاهد ايجابي=+C)

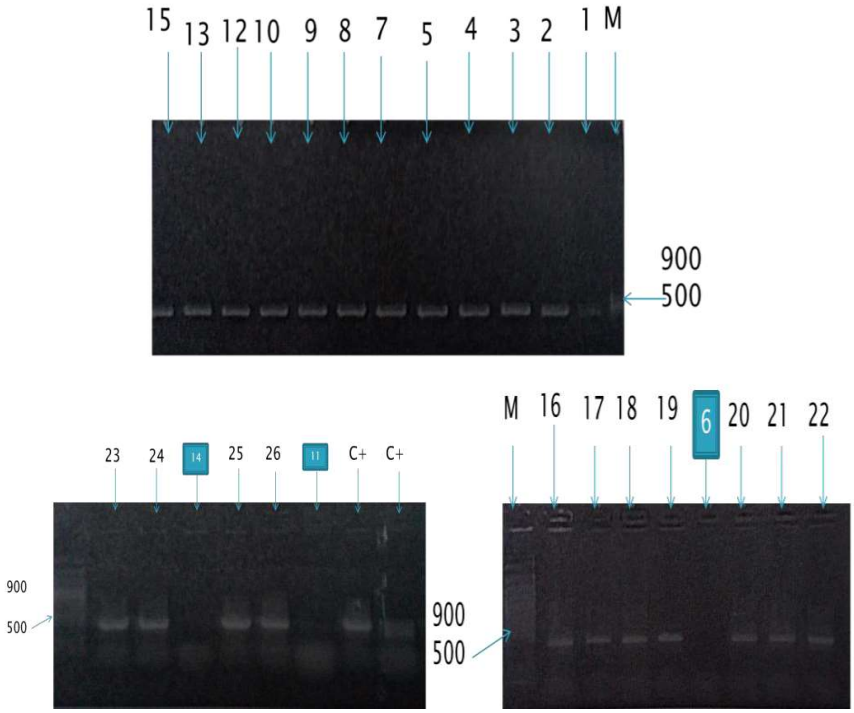


الشكل رقم (5): الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR باستخدام زوج البادئاتnod D حيث(1= r10.2, 2= r31.1, 3=r24.1, 4=r19.1, 5= r39.1, 6=r12.2, 7= r33.3.1, 8= r44.2, 9= r12.1, 10= r45A.1, 11= r26.1, 12=r46.1, 13= r31.2, 14=r32.1, 15= r27.1.1, 16=r29.1.1, 17= r20.2, 18= r20.1, 19= r19.4, 20= r42.1, 21= r49A.2, 22=r8.2.1, 23= r16.2, 24= r49A.1, 25= r17.3.1, 26= r27.2.2 شاهد سلبي=-C, شاهد ايجابي=+C)

صور توضح نتائج اختبار تخصصية البادئ nif H



الشكل رقم (6): صور توضح تخصصية البادئ nif H بجنس *Mesorhizobium*.



الشكل رقم (7: الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR باستخدام زوج البادئات nif H. حيث (1= r10.2, 2= r31.1, 3=r24.1, 4=r19.1, 5= r39.1, 6=r12.2, 7= r33.3.1, 8= r44.2, 9= r12.1, 10= r45A.1, 11= r26.1, 12=r46.1, 13= r31.2, 14=r32.1, 15= r27.1.1, 16=r29.1.1, 17= r20.2, 18= r20.1, 19= r19.4, 20= r42.1, 21= r49A.2, 22=r8.2.1, 23= r16.2, 24= r49A.1, 25= r17.3.1, 26= r27.2.2 شاهد سلبي=-C, شاهد ايجابي=+C)

6-الاستنتاجات والتوصيات:

6-1-الاستنتاجات:

1. تم الحصول على عزلات نقية، تتبع عائلة الريزوبيا بناءً على صفاتها الكيميائية الحيوية ، متعايشة مع جذور نبات الحمص و قادرة على تشكيل عقد جذرية (العدوى الاصطناعية)، كما بينت الاختبارات المجهرية والمزرعية والبيوكيميائية والجزيئية انتماءها للجنس *Mesorhizobium*، كخطوة أساسية لإعداد لقاح بكتيري يستعمل كسماد حيوي يستخدم في تلقيح بذور الحمص على المستوى الاقتصادي لاحقاً.

6-2-التوصيات:

1. متابعة العمل على المستوى الجزيئي لتعريف البكتريا على مستوى النوع والسلالة والحصول على بيانات كافية ووافية عن هذه العزلات.
2. إجراء دراسات مماثلة على عزلات من مختلف المناطق في سورية.

7-المراجع:

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

2. كرد علي، فواز . (2001). التثبيت الحيوي للأزوت الجوي. دمشق: منشورات هيئة الطاقة الذرية السورية، ص: 124-132.

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

2-Belal, S., Hassan, M. M., and El-Ramady, H. R. (2013). phylogenetic and characterization of salt-tolerant rhizobial strain nodulating faba bean plants. African Journal of Biotechnology, 12: 4324-4337.

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

4-Chen, W., Li, G., Qi, Y., ET., W., Yuan, H., and LI, J. (1991). *Rhizobium huakuii sp. nov.* isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 41(2): 275-280.

5-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.

6-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.

7-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.

8-Downie, J.A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS microbiology reviews, 34(2): 150-170.

9-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.

10-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.

11-Guerts, R., and Bisselling, T., (2002). *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. The Plant Cell 14.suppl 1: S239-S249.

12-Haukka, k., Lindström, k., Peter, J. and Young, W. (1998). Three Phylogenetic Groups of nodA and nifH Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. Applied and Environmental Microbiology., 64(2): 419-426.

13-Heldmaier, G. and Werner, D. (2003). Environmental signal processing and adaptation. Springer. Berlin, Germany, p: 20-21.

14-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.

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

16-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.

17-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.

18-Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., and Amarger, N., (2001). Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology. 147: 981–993.

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

20-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.

21-Long, S. R. (2001). Genes and Signals in the Rhizobium-Legume Symbiosis. American Society of Plant Physiologists., 125 (1): 69-72.

22-Maatallah, J. , Berraho, E.B., Munoz, S., Sanjuan, J. and Lluch, C., (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. Journal of Applied Microbiology.(93):531-540.

23-Maj, D., Wielbo, J., Marek-Kozaczuk, M., and Skorupska, A., (2010). Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. Microbiological research., 165(1): 50-60.

24-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.

25-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.

26-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.

27-Nour, S., Fernandez, M., Normand, P., and Cleyet-Marel, J.C. (1994). *Rhizobium ciceri sp. nov.,* consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum L.*). International journal of systematic bacteriology, 44(3): 511-522.

28-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: 35-46.

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

30- Qiu, W., Xu, H., Takalkar, S., Gurung, A. S., Liu, B., Zheng, Y., ... and Liu, G., (2015). Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence. Biosensors and Bioelectronics, 64: 367-372.

31-Rascio, N., and La Rocca, N., (2013). Biological Nitrogen Fixation: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Amsterdam: Elsevier Inc., 10: 1016.

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

33-Shamseldin, A. (2013). The Role of Different Genes Involoved in Symbiotic Nitrogen Fixation – Review. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 8 (4): 84-94.

34-Smith, M. A. and Bidochka, M. J., (1998). Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. Canadian Journal of Microbiology, 44(4): 351-355.

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

36-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.

37-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).

38-The Legume Phylogeny Working Group. (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades Legume phylogeny and classification in the 21st century: progress, prospects and lessons for other species-rich clades. Taxon, 62: 217–248.

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.