مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 40 العدد 2 (2025): 301- 316

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 40 No.2 (2025): 301 - 316

عزل بكتريا الرايزوبيا من جذور بعض البقوليات وتعريفها باستخدام الطرائق الكيميائية الحيوية والجزيئية والعدوى الاصطناعية

منال الدوس[1*]، محمود أبوغرة[2]، محمد فواز العظمة[3]

[1]طالبة دكتوراه، جامعة دمشق، كلية الزراعة ، قسم علوم وقاية النبات، مهندسة زراعية، مخبر التنوع الحيوي، الهيئة العامة للتقانة الحيوية.
manal.aldous@damascusuniversity.edu.sy.

[2] أستاذ، جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم علوم وقاية النبات.

[3] أستاذ، جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم علوم وقاية النبات.

الملخص:

نُفذ البحث في مختبر التنوع الحيوي والبيت الزجاجي التابعين للهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق خلال عامي 2019–2020 بهدف عزل بكتريا الرايزوبيا من جذور بعض البقوليات البرية والمزروعة وتعريفها.

جُمعت عينات من النباتات البقولية (فول، حمص، بازلاء، حندقوق، فصة، نفل، فول الصويا، بيقية، عدس) من عدة محافظات في سورية (ريف دمشق، حمص، درعا، السويداء، اللاذقية، حماة، الرقة)، وعزلت البكتريا من العقد الجذرية لهذه النباتات على وسط آغار الخميرة والمانيتول Yeast mannitol agar. نتج عن العزل 109 عزلات بكتيرية، استبعدت منها 5 عزلات ظهرت باللون الأحمر على وسط YMA مع أحمر الكونغو و44 عزلة موجبة غرام، بينما أظهرت نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية و الجزيئية والعدوى الاصطناعية لبقية العزلات (61عزلة) أن 42 منها تنتمي إلى مجموعة رايزوبيا حيث نمت على الوسط المغذي بشكل مستعمرات قشدية، ومحدبة، وتامة الحواف، ومخاطية، تميزت بأنها موجبة لاختبار الكاتالاز والأكسيداز و BTB و استقلاب السكريات (غلوكوز، لاكتوز، مالتوز)، وسلبية لاختبار MR واختبار غرام وشكلت عقداً جذرية على جذور النباتات المضيفة، بينما أظهرت 19 عزلة صفات مخالفة للمذكورة سابقاً وبالتالي فهي لاتنتمي إلى بكتريا العقد الجذرية.

الكلمات المفتاحية: رايزوبيا، الاختبارات الحيوية الكيميائية ، النباتات البقولية، سورية.

تاريخ الايداع:2023/8/23
تاريخ القبول: 2023/10/23

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

Isolation of Rhizobia from roots of some legumes and identification using biochemical tests, artificial infection, and molecular test

Manal Al-Dous [1*], Mahmoud abu Ghoura[2], Mohammad Fawaz Azmeh[3]

1 PhD student, Damascus University, Faculty of Agriculture, Plant Protection department, Agriculture Engineer in Laboratory of Biodiversity Syrian National Comission for Biotechnology
manal.aldous@damascusuniversity.edu.sy

2 Professor, Damascus University, Faculty of Agriculture, Plant Protection department.

3 Professor, Damascus University, Faculty of Agriculture Plant Protection department,

Received: 23/8/2023
Accepted: 23/10/2023

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

The research was conducted in the Biodiversity Laboratory and the Greenhouse of Syrian National 47 Commission for Biotechnology in Damascus during the years 2019 and 2020 with the aim of isolating and identifying rhizobia from the roots of some wild and culivated legumes.

Samples of leguminous plants (beans, chickpeas, peas, chicory, alfalfa, trifolium, soybeans, vetch, and lentils) were collected from several governorates in Syrian (Damascus countryside, Homs, Daraa, As-Suwayda, Lattakia, Hama, and Raqqa). 109 bacterial strains were isolated from the root nodules of these plants on Yeast mannitol agar medium. 5 isolates that appeared red on YMA medium with Congo red, and 44 Gram positive isolates were excluded, while the results of biochemical, molecular, and synthetic infection tests showed that 42 isolates belonged to Rhizobia, which grew on the nutrient media in the form of creamy, convex, well-edged, and mucous colonies, characterized as positive for catalase, oxidase, BTB, and sugars metabolism (glucose, lactose, maltose), and were negative for MR and gram test, and formed nitrogenous nodules on the roots of the host plants, while 19 isolates showed characteristics contrary to the previously mentioned and therefore they do not belong to the root nodules bacteria

Keywords: Rhizobia, Biochemical Test, Legumes, Syria.

1- المقدمة Introduction:

تعد المحاصيل البقولية من أهم وأقدم المحاصيل التي زرعها الإنسان واعتمد عليها في غذائه، حيث تعتبر مصدراً مهماً للبروتين، وحمض الفوليك والحديد والفوسفور والكربوهيدرات والمغنزيوم والكالسيوم وفيتامين سي وهذا المحتوى الغني جعلها غذاءً مناسباً خاصة لشعوب الدول الفقيرة، إضافة إلى فائدة هذه المحاصيل في تخصيب الأراضي الزراعية (عطية، 2017، 916).

ترتبط المحاصيل البقولية بعلاقة تعايش مع الرايزوبيا، وتعرف هذه البكتريا بأنها مجموعة من البكتريا الساكنة للتربة والتي ترتبط بعلاقة تعايش مع جذور النباتات البقولية وتشكل عقداً جذرية، تستوطن ضمنها وتثبت الآزوت الجوي، حيث يزود النبات المضيف البكتريا بمصدر للحموض العضوية والكربون بينما تثبت البكتريا الآزوت الجوي وتحوله إلى أمونيا فتجعله متاحاً للنبات (Wang, 2019, 4).

يعد الجنس Rhizobium أول جنس وصفه العالم Frank (1889) في نيوزلاندا، وحالياً يضم 49 نوعاً ويتم تعريف الرايزوبيا على المستوى الجزيئي بالاعتماد على الكشف عن مورثات nod المميزة لهذه البكتريا (Weir, 2006, 223).

يعد العالم Beijerinck أول من استطاع عزل وتنمية بكتريا Rhizobium من عقد البقوليات عام 1888 وسماها radicicola Bacillus. لاحقاً صنف Bergy هذه البكتريا تحت جنس Rhizobium، وفي عام 1889 تم تعريف أول نوع ينتمي لهذا الجنس Rhizobium leguminosarum من قِبل Frank عام 1889 (Liu *et al.*, 2014a, 87).

حالياً فإن الأجناس الأكثر شهرة من Rhizobia تنتمي للعائلة Rhizobiaceae: Rhizobium، Ensifer (Sinorhizobium)، Allorhizobium، Pararhizobium، Neorhizobium، Shinella، والعائلة Phyllobacteriaceae : Mesorhizobium، Aminobacter، Phyllubacterium، والعائلة Brucellaceae: Ochrubactrum، والعائلة Methylobacteriaceae: Methylobacterium، Microvirga، والعائلة Bradyrhizobiaceae: Bradyrhizobium، والعائلة Xanthobacterzceae: Azorhizobium، والعائلة Hyphomicrobiaceae: Devosia. ولكن بعضها ينتمي إلى Burkholderiaceae مثل Paraburkholderia، Cupriavidus، Trinickia (De lajudie *et al.*, 2019a, 1835; De lajudie *et al.*, 2019b, 1852).

يتجدد ويتغير تصنيف هذه المجموعة من البكتريا باستمرار نظراً إلى تطور تقانات البيولوجيا الجزيئية، فعلى سبيل المثال في عام 1990 عرف نوع واحد من البكتريا يتعايش مع جذور نبات الفاصولياء وسمي Rhizobium leguminosarum sv. Fredii بينما الآن سُجل ثلاثة أنواع من الرايزوبيا قادرة على التعايش مع جذور الفاصولياء (Shamseldin *et al.*, 2017, 91).

نظراً إلى أهمية هذه البكتريا فقد هدف البحث إلى عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية للنباتات البقولية، وتعريف البكتريا المعزولة باستخدام الطرق الكيميائية الحيوية، والعدوى الاصطناعية، وتقانة Colony-pcr (تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام المستعمرة البكتيرية).

2-الدراسة المرجعية Literature review:

تتميز النباتات البقولية بقدرة فريدة على إنشاء علاقة تعايش (تكافل) مع البكتريا الساكنة للتربة والمثبتة للآزوت التي تسمى الرايزوبيا. يحدث التفاعل التكافلي بين الرايزوبيا والنبات البقولي من خلال تبادل إشارات معقدة، يبدأ بإفراز النبات لمركبات فلافونيدية Flavonoid تتعرف عليها أنواع الرايزوبيا المتوافقة والتي بدورها تنتج عوامل تسمى عوامل Nod وهي عبارة عن Lipo-chito-oligosaccharide (قليلات السكاريد الكيتو – الدهنية) يتعرف عليها النبات البقولي المضيف ويزداد إنتاج الكالسيوم في خلايا القشرة الداخلية للجذر وتحدث انقسامات خلوية تؤدي إلى تشكل العقيدات الأولية، وتتجعد الشعيرات الجذرية فيتشكل ما يسمى

بخيط العدوى ثم تتوضع البكتريا داخل الخلايا وتحاط بغشاء وتأخذ شكل Bacteroides وتبدأ عملها في تثبيت الآزوت الجوي بتحويل الآزوت إلى أمونيا فيستطيع النبات البقولي استخدامها والاستفادة منها (Hawkins and Oresink, 2021, 1).

تشكل معظم نباتات العائلة البقولية عقداً جذرية خلال العلاقة التعايشية الفعالة (التي تؤدي إلى تثبيت الآزوت) مع عدد قليل أو حتى مع أنواع أو سلالة وحيدة من الرايزوبيا والعكس صحيح، وهذه الاستراتيجية (الانتقائية) تهدف لمنع التعايش غير الفعال مع رايزوبيا غير قادرة على تثبيت الآزوت. وتطبق هذه الانتقائية خلال كل مراحل التعايش (Walker *et al.*, 2020, 2). أشار Radutoiu وآخرون (2007) إلى أن النبات Medicago truncatula و البكتريا Mesorhizobium loti لايمكن أن يشكلا علاقة تعايشية إطلاقاً (3923)، كما ذكر Liu وآخرون (2014b) أن البكتريا Sinorhizobium meliloti تستطيع أن تتفاعل مع M. truncatula في المراحل المبكرة من العلاقة التعايشية وتؤدي إلى تجعد الشعيرات الجذرية لكنها تفشل لاحقاً في استعمار الجذر أو تكوين العقد، أو قد يؤدي هذا التفاعل إلى تشكل عقد لاتحتوي على بكتريا أوغير فعالة في تثبيت الآزوت (1). ومن الأمثلة الأخرى على تخصص الرايزوبيا العزلة S. meliloti 1021 المتعايشة طبيعياً مع M. sativa وتملك القدرة على تشكيل العقد على M. truncatula ومع ذلك تكون فعالية تثبيت الآزوت خلال تفاعلها مع M. truncatula أقل فعلياً مما لو تفاعل الأخير مع العزلة S. meliloti 1022 والعزلة S. medicae 419 (Kazmierczak *et al.*, 2017, 399). كذلك أجرى Alhayali و Al-shakarchi (2021) تجربة ضمن أصص زرعت فيها بذور نباتات بقولية ولقحت بمعلقات بكتيرية فشكلت كل عزلة عقداً جذرية على نباتها العائل (163).

تحمل بكتريا الرايزوبيا مجموعة من المورثات تميزها من غيرها من الأنواع والأجناس البكتيرية وهي مورثات nod تقسم هذه المورثات إلى مورثات عامة توجد في كل أجناس رايزوبيا بنسخة واحدة وهي (nodA, nodB, nodC) ومنها مورثات خاصة مميزة لكل جنس بكتيري(Shamseldin, 2013, 86)، وذكر Bonaldi وآخرون (2010) أن المورثات (nodA, nodB, nodC) هي المورثات الأساسية في عملية التثبيت الحيوي للآزوت (761). فالكشف عن إحدى تلك المورثات في البكتريا يشير إلى أنها تنتمي إلى مجموعة الرايزوبيا ولكن إلحاق العزلة البكتيرية بأحد الأجناس يتطلب الكشف عن المورثات الخاصة المميزة لكل جنس.

3-مواد البحث وطرائقه Materials and Methods:

تم تنفيذ البحث في مختبر أمراض النبات البكتيرية في كلية الهندسة الزراعة –جامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

جمع العينات النباتية:

جمعت عينات عشوائية من النباتات البقولية بعمر 6-8 أسابيع لعام 2019-2020 من عدة مناطق في سورية والمزروعة بالمحاصيل البقولية، بمعدل أربعة نباتات من كل حقل. وضعت 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 (الجدول 1).

الجدول(1): مناطق جمع العينات النباتية.

النبات البقولي	عدد العينات	منطقة الجمع	المحافظة
فول Vicia faba	6	قدسيا	ريف دمشق
	10	عدرا	
	3	النشابية	
	2	الكسوة	
	1	أبوجرش	
	4	كفربطنا	
فصة Medicago sativa	5	النبك	
	4	أبوجرش	
بازلاء Pisum sativum	2	أبوجرش	
عدس Lens culinaris	3	أبوجرش	
حلبة Trigonella foenum-graecum	4	النبك	
حندقوق Melilotus Indicus	9	أبوجرش	
حمص Cicer arietinum	4	جباب	درعا
حمص Cicer arietinum	4	ولغا	السويداء
	3	كفراللحف	
	5	القنوات	
	6	صلخد	
	4	ديمة اللحف	
فول Vcia faba	5	كفراللحف	
فصة Medicago sativa	2	كفر اللحف	
بيقية Vicia sp.	1	عرمان	
	4	صلخد	
النفل/برسيم Trifolium pratense	2	صلخد	
قتاد Astragalus mollis	4	صلخد	
فول Vicia faba	1	بتمانا	اللاذقية
	3	زغرين	
حمص Cicer arietinum	1	مركز بحوث حمص–الدوير	حمص
عدس Lens culinaris	2	مركز بحوث حمص–الدوير	
بازلاء Pisum sativum	3	مركز بحوث حمص–الدوير	
حندقوق Melilotus Indicus	1	مركز بحوث حمص–الدوير	
فول Vicia faba	1	ريف السلمية	حماة
فول الصويا Glycine max	2	السحل	الرقة

عزل البكتريا:

تم فصل الجذر عن المجموع الخضري، وغُسلت الجذور من التراب تحت الماء الجاري وعُقمت باستخدام الكحول الإيتيلي 70% مدة دقيقتين ثم هيبو كلوريت الصوديوم 1.5% مدة 5 دقائق وأخيراً الغسل بالماء المقطر المعقم.

تم تعقيم جفنة الطحن و وضعت العقد المعقمة فيها، وأضيف 2 مل من الماء المقطر المعقم وتم الطحن. تركت العقد المطحونة بماء الطحن 5 دقائق ثم أخذ 100 ميكروليتر من ماء الطحن وحضرت التخفيفات التالية 1/10، 1/100، 1/1000 ونشر 25 ميكروليتر من التخفيف 1/1000 على طبق يحوي وسط الخميرة والمانيتول مضافاً إليه أحمر الكونغو (1%) yeast manitol agar(YMA) (Islam، 1984).

حُضنت الأطباق على درجة حرارة 28^{o} س مدة 48 ساعة ونقلت المستعمرات المنفردة إلى أطباق جديدة و رُمزت وحضنت بنفس الشروط السابقة، وتمت دراسة الصفات المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية النامية.

تعريف البكتريا بالطرائق الحيوية الكيميائية:

عرفت العزلات باستخدام اختبار غرام (KOH 3%) ومجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية: اختبار أحمر الكونغو، واختبار الكاتالاز، واختبار الأوكسيداز، واختبار استقلاب الغلوكوز واللاكتوز والمالتوز، واختبار تحلّل الجيلاتين، واختبار تحلّل النشاء (Hossain *et al.*, 2019, 1) ، واختبار التنفس (Hanson, 2008, 1)، واختبار Methyl red (McDevitt, 2009, 1) ، واختبار Bromothymol blue test (BTB) (Alhayali and Al-shakarchi, 2021, 163).

العدوى الاصطناعية:

جمعت تربة زراعية من مزارع أبو جرش في كلية الزراعة وتم تعقيمها في الأوتوكلاف مرتين لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 121 ^{o} س، وتركت لمدة 15 يوم لتستعيد تجانسها ثم وزعت التربة على الأصص المعقمة، تم تعقيم بذور البقوليات بالكحول الإيتيلي 95% لمدة دقيقة والغسل بالماء المقطر المعقم ثم زرعت ضمن الأصص، بمعدل خمسة مكررات لكل نبات و 3بذور في كل أصيص.

بعد الإنبات، جُددت العزلات البكتيرية وحضرت معلقات بكتيرية من كل منها بعد 48 ساعة بتركيز (3×10^{8} CFU/ml) و لقح 1مل من كل معلق ضمن دوارق تحوي 50 مل من وسط مستخلص الخميرة والمانيتول السائل YM، وتم التحضين عند درجة حرارة 28 ^{o} س مع الرج 100 دورة/ دقيقة لمدة 48 ساعة، ثم سُقي كل أصيص بـ 12 مل من المعلق البكتيري للعزلة الواحدة.

قُلعت النباتات بعد 6–8 أسابيع من الزراعة حسب نوع النبات البقولي وسُجِلَ وجود أو غياب العقد على جذورها.

الاختبارات الجزيئية Colony-Polymerase chaine reaction (Colony-PCR):

أجري اختبار تعريف البكتريا باستخدام تقانة Colony- PCR للكشف عن أحد المورثات العامة لدى كل أجناس الرايزوبيا وهي مورثة nodA (Haukka *et al.*, 1998, 419; Zhang *et al.*, 2000, 2988) وذلك باستخدام زوج البادئات (الجدول 2).

الجدول(2): تتابع النكليوتيدات في البادئ المستخدم للكشف عن مورثة nodA عند بكتريا الرايزوبيا.

المورثة	التسلسل النكليوتيدي للبادئات	درجة الحرارة Tm	حجم المنتج bp	المرجع
*nodA	For 5'-TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA-3' Rev 5'- GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA-3'	55	666	(Haukka *et al.*, 1998)

***حيث** N: C/G/T/A **و** W: T/A **و** R: G/A.

وأجري تفاعل PCR باستخدام جهاز المدور الحراري وفق الشروط المحددة للبادئ (الجدول 3). بعد إتمام المدور الحراري لدوراته (40دورة) تم الكشف عن نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي بتطبيق تيار 100 فولط على هلامة أغاروز 1% ضمن محلول TBE 1x، بالمقارنة مع سلم جزيئي 1kb، وتم إظهار الحزم بعد الصبغ بمحلول Red safe بالتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system.

الجدول(3): مراحل تفاعل الـ PCR باستخدام البادئ nodA.

المرحلة	تكسير الجدر الخلوية	فصل سلسلتي الدنا	ارتباط البادئات Tm	استطالة السلسلة	استكمال الاستطالة
درجة الحرارة (^oC)	94	94	55	72	72
الزمن بالدقيقة	5	1	1	1	10

4-النتائج والمناقشة Results and Discussion:

-عزل البكتريا وتعريفها:

تعريف البكتريا باستخدام الطرائق الحيوية الكيميائية:

تم عزل 109 عزلة بكتيرية من العقد الجذرية على جذور النباتات البقولية موضحة في الجدول (4) حسب منطقة الجمع.

الجدول (4): التوزع الجغرافي للعزلات البكتيرية والعائل النباتي.

النبات البقولي	رمز العزلة	منطقة الجمع	المحافظة
فول	$R_{44}-R_{43}-R_{42}-R_{41}-R_{40}-R_{39}$	قدسيا	ريف دمشق
	$R_{111}-R_{110}-R_{109}-R_{108}-R_{107}-R_{106}-R_{38}-R_{37}-R_{36}-R_{35}$	عدرا	
	$R_{66}-R_{65}-R_{64}$	النشابية	
	$R_{101}-R_{100}$	الكسوة	
	$R_{134}-R_{134B}-R_{133}$	أبوجرش	
	$R_{86}-R_{85}-R_{84}-R_{83}$	كفربطنا	
فصة	$R_{76}-R_{75}-R_{74}-R_{73}-R_{72}$	النبك	
	$R_{96}-R_{95}-R_{94}-R_{93}$	ابوجرش	
بازلا	$R_{136}-R_{135}$	أبوجرش	
عدس	$R_{130}-R_{129}$	أبوجرش	
حلبة	$R_{126}-R_{121}-R_{120}-R_{119}$	النبك	
حندقوق	$R_{60}-R_{59}-R_{58}-R_{57}-R_{56}-R_{55}-R_{54}-R_{53}-R_{52}$	أبوجرش	
حمص	$R_{51}-R_{50}-R_{49}-R_{48}$	جباب	درعا
حمص	$R_{47}-R_{46}-R_{45'}-R_{45}$	ولغا	السويداء
	$R_{63}-R_{62}-R_{61}$	كفراللحف	
	$R_{81}-R_{80}-R_{79}-R_{78}-R_{77}$	القنوات	
	$R_{92}-R_{91}-R_{90}-R_{89}-R_{88}-R_{87}$	صلخد	
	$R_{105}-R_{104}-R_{103}-R_{102}$	ديمة اللحف	
فول	$R_{71}-R_{70}-R_{69}-R_{68}-R_{67}$	كفراللحف	
فصة	$R_{99}-R_{98}$	كفر اللحف	
بيقية	R_{150}	عرمان	
	$R_{132}-R_{131}$	صلخد	
قتاد	$R_{125}-R_{124}-R_{123}-R_{122}$	صلخد	
النفل	$R_{128}-R_{127}$	صلخد	
فول	R_{97}	بتمانا	اللاذقية
	$R_{139}-R_{138}$	زغرين	
حمص	R_{117}	مركز بحوث حمص–الدوير	حمص
عدس	$R_{116}-R_{115}$	مركز بحوث حمص–الدوير	
بازلاء	$R_{114}-R_{113}-R_{112}$	مركز بحوث حمص–الدوير	
حندقوق	R_{118}	مركز بحوث حمص–الدوير	
فول	R_{141}	ريف السلمية	حماة
فول الصويا	$R_{300}-R_{200}$	السحل	الرقة

أظهرت نتائج العزل على الوسط الانتخابي YMA مع أحمر الكونغو بعد 48 ساعة من التحضين، مستعمرات بكتيرية ذات لون كريمي وردي باهت، ودائرية الشكل، وتامة الحواف، ومخاطية، باستثناء 5 عزلات ظهرت بلون أحمر باهت على وسط الزرع

واستبعدت من الدراسة نظراً لأن البكتريا التي لاتنتمي لجنس الرايزوبيا تمتص صبغة الكونغو من الوسط وتظهر مستعمراتها بلون أحمر أو وردي غامق أو أحمر باهت (Astuti and Mulyono, 2021, 637).

وعند إجراء اختبار غرام المعتمد على مزج جزء من المستعمرة البكتيرية مع قطرة من محلول KOH 3% لوحظ أن 60 عزلة سالبة الغرام بينما كانت 44 عزلة موجبة الغرام وتم استبعادها من بقية الاختبارات باعتبار بكتريا الرايزوبيا سالبة الغرام حسب (Astuti and Mulyono, 2021, 637).

تميزت جميع العزلات بأنها موجبة لاختبار الكاتالاز والأكسيداز و BTB و استقلاب السكريات (غلوكوز، لاكتوز، مالتوز)، وسلبية لاختبار MR ، باستثناء العزلات (54–77–81–86–90–91–92–93–95–97–108–116–117–119–131–133–136–141–150) فقد كانت موجبة لاختبار MR وسالبة لاختبار الأوكسيداز. وكان معظم العزلات هوائية لاهوائية بينما تباينت نتائجها بالنسبة لاختبار تحلل النشاء والجيلاتين وهذا يتوافق مع الدراسات المرجعية التي أظهرت تباينات كبيرة في نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية حيث أظهرت دراسة للباحثين Wubie و Adal **(2021)** على رايزوبيا الحمص أن 91% من العزلات حللت الجيلاتين و 78% حللت النشاء و91% حللت الاكتوز والسكروز وجميع العزلات حللت سكريات المالتوز والغلوكوز، بينما ذكر Oryakhil و Irfan **(2020)** أن عزلات الرايزوبيا المعزولة من الحمص لم تحلل الجيلاتين وتباينت في قدرتها على استقلاب النشاء. أما الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية للبازلاء فقد حللت نسبة 12% فقط من العزلات الجيلاتين (Deshwal and Chaubey, 2014, 464).

على الرغم من تباين النتائج السابقة ولكن يعد التوصيف الكيميائي الحيوي للسلالات الجديدة أمر مهم لأنه يوفر معلومات عن هذه السلالات ويساعد في تحديدها السريع والصحيح، وبغض النظر عن دقة هذه الاختبارات لكنها تساعد في اختبار العزلة المثالية والأفضل اقتصادياً وزراعياً عند استخدامها كمخصب حيوي نظراً لأن هذه الاختبارات تعطي أيضاً معلومات عن درجات الحرارة والأس الهيدروجيني المناسب لنمو كل سلالة وبالتالي اختيار السلالة الأمثل للتربة والمناخ (Nakei *et al.*, 2022, 23).

تشير نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية إلى أن العزلات (54– 77– 81– 86– 90– 91– 92– 93– 95– 97– 108– 116– 117 – 119–131– 133– 136– 141– 150) من الممكن ألا تنتمي للرايزوبيا نظراً لاختلاف نتائج اختباراتها مع الصفات المرجعية لهذه البكتيريا التي تؤكد أن بكتريا الرايزوبيا إيجابية لاختبار الأوكسيداز وسلبية لاختبار MR (Hossain *et al.*, 2019, 400).

الجدول(5): الخصائص الكيميائية الحيوية للعزلات البكتيرية.

رمز العزلة	الكاتالاز	تحلل النشاء	Methyl red	BTB	تحلل الجيلاتين	أوكسيداز	استقلاب غلوكوز لاكتوز مالتوز	التنفس	
								هوائي	لاهوائي
35	+	+	−	+	+	+	+	−	+
36	+	+	−	+	−	+	+	+	−
38	+	−	−	+	+	+	+	+	−
40	+	−	−	+	+	+	+	+	+
42	+	−	−	+	−	+	+	+	+
43	+	−	−	+	−	+	+	+	−
44	+	−	−	+	+	+	+	+	+
45	+	+	−	+	+	+	+	+	−
45'	+	−	−	+	+	+	+	+	+
46	+	−	−	+	+	+	+	+	+
47	+	+	−	+	+	+	+	+	+
54	+	−	+	+	−	−	+	−	+
61	+	−	−	+	+	+	+	+	+
62	+	+	−	+	−	+	+	+	+
69	+	+	−	+	−	+	+	+	−
72	+	−	−	+	+	+	+	+	−
73	+	−	−	+	+	+	+	+	+
74	+	+	−	+	+	+	+	+	+
75	+	+	−	+	+	+	+	+	−
76	+	−	−	+	+	+	+	+	+
77	+	+	+	+	+	−	+	+	−
79	+	+	−	+	+	+	+	+	+
81	+	+	−	+	+	+	+	+	+
83	+	−	−	+	+	+	+	+	+
84	+	−	−	+	+	+	+	+	−
86	+	+	+	+	+	−	+	+	+
88	+	−	−	+	+	+	+	+	−
90	+	−	+	+	+	−	+	+	+
91	+	+	+	+	−	−	+	+	+
92	+	+	+	+	+	−	+	+	+
93	+	+	+	+	+	−	+	+	+
94	+	+	−	+	+	+	+	+	+

95	+	+	+	+	+	−	+	+	+
97	+	+	+	+	+	−	+	+	+
98	+	−	−	+	+	+	+	+	+
99	+	+	−	+	+	+	+	+	+
100	+	+	−	+	+	+	+	+	+
102	+	−	−	+	+	+	+	+	+
103	+	+	−	+	+	+	+	+	+
108	+	+	+	−	+	+	+	+	+
109	+	+	−	+	+	+	+	+	+
110	+	+	−	+	+	+	+	+	+
113	+	−	−	+	+	+	+	+	−
114	+	−	−	+	+	+	+	+	−
116	+	+	+	−	+	+	+	+	+
117	+	+	+	−	+	+	+	+	+
118	+	+	−	+	+	+	+	+	+
119	+	+	+	−	−	+	+	+	+
126	+	+	−	+	+	+	−	+	+
127	+	−	−	+	+	+	+	+	−
128	+	−	−	+	+	+	+	+	+
131	+	+	−	+	+	−	−	+	+
132	+	+	−	+	+	+	+	+	+
133	+	+	+	−	+	+	+	+	+
134	+	+	−	+	+	+	+	+	+
135	+	+	−	+	+	+	+	+	+
136	+	+	+	−	+	+	+	+	+
141	+	+	+	−	−	+	+	+	+
150	+	+	+	−	−	+	+	+	+
200	+	+	−	+	+	+	+	+	+
300	+	+	−	+	+	+	+	+	+

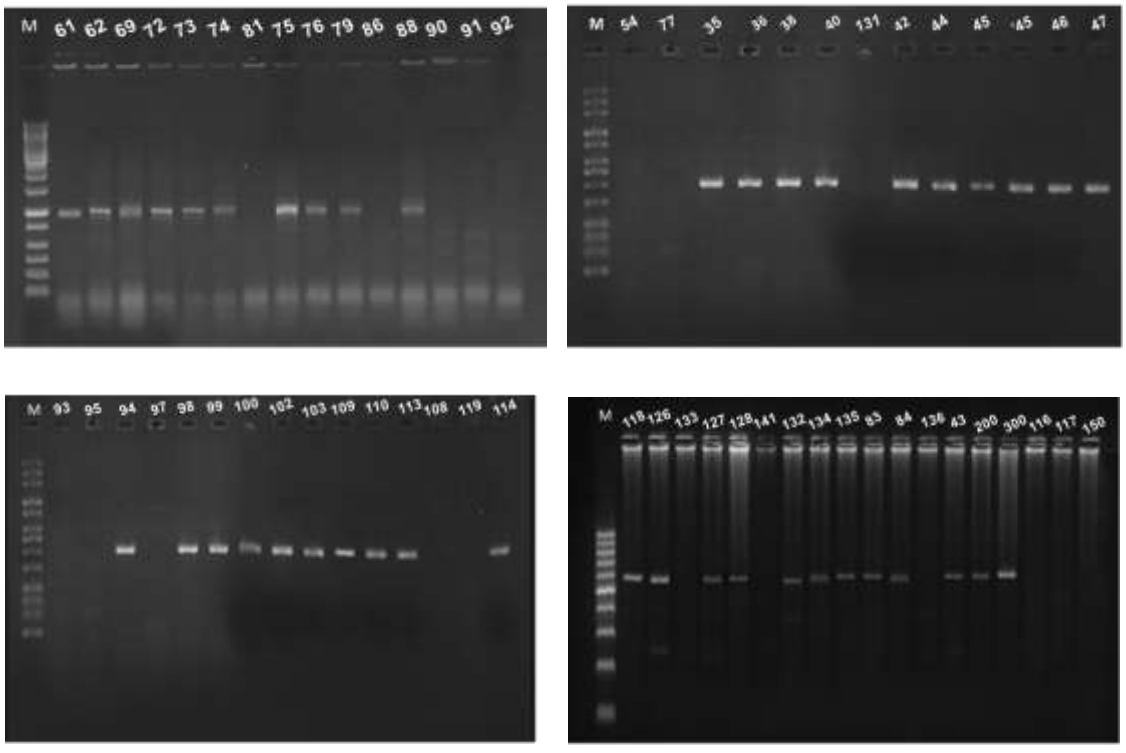
التعريف باستخدام العدوى الاصطناعية:

أجريت العدوى الاصطناعية بزراعة مجموعة من النباتات البقولية (فول، حمص، بازلاء، حندقوق، فصة، النفل، فول الصويا، بيقية، عدس) ضمن أصص تحتوي تربة معقمة بمعدل خمس مكررات لكل نبات وثلاث بذور في كل أصيص.

قلعت النباتات قبل الإزهار ولوحظ أن جميع العزلات شكلت عقد على النباتات البقولية ، كل عزلة حسب النبات الذي عزلت منه باستثناء العزلات (54– 77– 81– 86– 90– 91– 92– 93– 95– 97– 108– 116– 117– 119– 131– 133–- 141- 150 136) لم تشكل أي عقد جذرية وهذا يضيف سبباً آخر لاعتبار هذه العزلات ليست من بكتريا الرايزوبيا لعدم قدرتها على تشكيل العقد على جذور النباتات التي عزلت منها وهذا يتوافق مع Alhayali و Alshakarchi (**2021**).

التعريف باستخدام تقانة Colony-pcr:

أجري اختبار colony-pcr لـ 61 عزلة المدرجة في الجدول(5)، فأظهرت النتائج أن العزلات (54– 77– 81– 86– 90–91– 92 – 93– 95– 97– 108– 116– 117– 119– 131– 133– 136- 141- 150) التي لم تشكل عقد جذرية لم تعط أي حزمة أيضاً بينما أظهرت بقية العزلات حزمة حجم 666 bp (الشكل 1) وهذا يدعم تصنيف العزلات التي أعطت الحزمة على أنها رايزوبيا باعتبار هذه المورثة (nodA) عامة وموجودة لدى كل أجناس الرايزوبيا وهذا ما أشار إليه Zhang وآخرون (**2000**) وكذلك Lgolkina وآخرون (**2019**).



الشكل(1): الرحلان الكهربائي لنواتج PCR على هلامة الأغاروز1% باستخدام زوج البادئات nodA، وظهور حزم ذات وزن 666bp .

وهذه النتيجة تتوافق مع العديد من الباحثين الذين عرّفوا بكتريا الرايزوبيا وسلالاتها بالاعتماد على مورثة nodA باستخدام عدة طرق جزيئية وأثبتوا أن هذا المورث موجود لدى كل أجناس الرايزوبيا ومن الممكن تعريف هذه البكتريا بالاعتماد عليه مع ملاحظة اختلاف الطريقة المستخدمة في البحث عن الطرق التي استخدمها الباحثون الآخرون. حيث استطاع Haukka وآخرون (1998) تعريف 52 عزلة رايزوبيا معزولة من جذور الأشجار البقولية بالاعتماد على تسلسل (Sequence analysis) مورثة nodA و nifH، كما عرف Nakei وآخرون (2022) أربعة أجناس بكتيرية (Bradyrhizobium, Rhizobium, Mesorhizobium, Ensifer) تتعايش مع فول الصويا باستخدام طريقة البصمة الوراثية لمورثات تثبيت الآزوت nif ومورثات التعايش nod بمافيها المورثة nodA.

توافقت نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية مع العدوى الاصطناعية والاختبارات الجزيئية، وبينت الدراسة أن **42** عزلة تنتمي لأجناس الرايزوبيا بينما **19** عزلة لاتنتمي للرايزوبيا.

الاستنتاجات Conclusions:

1-نتج عن العزل من العقد الجذرية عزلات رايزوبيا وعزلات أخرى لابد من إخضاعها لاختبارات إضافية للتأكد من تصنيفها وهل هي ناتجة عن تلوث أم هي بكتريا مرافقة مستعمرة للعقد أو سطحها.

2-هناك تباين بين العزلات من حيث نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية وبالتالي لايمكن الاستناد على هذه الاختبارات فقط لتعريف الرايزوبيا.

3- يمكن تعريف العزلة البكتيرية على أنها رايزوبيا أم لا باستخدام العدوى الاصطناعية والكشف عن المورثات العامة ولكن لايمكن تحديد الجنس أو النوع إلا بالطرائق الجزيئية المعتمدة على الكشف عن مورثات nod المتخصصة.

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. عطية، شهيرة محمد رضا إبراهيم. (2017). محددات استجابة عرض المساحة المزروعة من المحاصيل البقولية في مصر. Journal of Agricultural Economics and Social Sciences . **8(12): 915–921.**
2. Alhayali S. M. and Al-Shakarchi, M. A. (2021). Genetic diagnosis of root nodules bacteria isolated from some leguminous Plants in Nineveh Governorate. Journal of Education and Science. 30(5): 163-177.
3. Astuti, A., Mulyono, R. F. (2021). Characterization of Rhizobium Indigenous Isolates and Their Compatibility with Edamame Soybean. Earth and Environmental Science. 752.
4. Bonaldi, K., Gourion, B., Fardoux, J., Hannibal, L., Cartieaux, F., Boursot, M., et al. (2010) Large-scale transposon mutagenesis of photosynthetic Bradyrhizobium sp. strain ORS278 reveals new genetic loci putatively important for nod-independent symbiosis with Aeschynomene indica. Mol Plant Microbe Interact. 23: 760–770.
5. De Lajudie, Ph., Peter, J. and Young, W. (2019a). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Rhizobia and Agrobacteria Minutes of the meeting by video conference, 11 July 2018. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 69:1835–1840.
6. De Lajudie Ph. M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanovic, N., Lassalle, F., Lindström, K., Mhamdi, R., Martínez-Romero, E., Moulin, L., Abdollah Mousavi, S., Nesme, X., Peix, A., Puławska, J., Steenkamp, E., Stępkowski, T., Tian, Ch., Vinuesa, P., Wei, G., Willems, A., Zilli, J. and Young, P. (2019b). Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria. . International journal of systematic and evolutionary microbiology. 69:1852–1863.
7. Deshwal, V.K. and Chaubey, A. (2014). Isolation and Characterization of Rhizobium leguminosarum from Root nodule of Pisum sativum L. Journal of Academia and Industrial Research (JAIR). 2(8): 464-467.
8. 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.
9. Hossain, A., Gunri, S. K., Barman, M., EL Sabagh, A. and da Silva, J. A. T. (2019). Isolation, characterization and purification of Rhizobium strain to enrich the productivity of groundnut (Arachis hypogaea L.). Open Agriculture. 4: 400-409.
10. Hawkins, J. P. and Oresnik, I. J. (2021). The Rhizobium-legume symbiosis: co-opting successful stress management. Front plant science. 12: 796045.
11. Hanson, A. (2008). Oxidative-Fermentative Test Protocol. American Society for Microbiology. 7p.
12. Islam, R. (1984). Collection, isolation and maintenance of food legume Rhizobia. In"Genetic resources and their utilization". J. R. Witcombe. ICARDA, Aleppo, Syria. P.51-59.
13. Kazmierczak, T., Nagymihály, M., Lamouche, F., Barriére, Q., Guefrachi, I., Alunni, B., et al. (2017). Specific host-responsive associations between Medicago truncatula accessions and Sinorhizobium strains. Mol. Plant Microbe Interact. 30, 399–409. doi: 10.1094/MPMI-01-17-0009-R.
14. Liu, Y., Wang, R. and Zeng, R. (2014a). Permanent draft genome of the malachite-green-tolerant bacterium Rhizobium sp. MGL06. Journal Elsevier. 18: 87–88.
15. Liu, J., Yang, S., Zheng, Q., and Zhu, H. (2014b). Identification of a dominant gene in Medicago truncatula that restricts nodulation by Sinorhizobium meliloti strain Rm41. BMC Plant Biol. 14:167. doi: 10.1186/1471-2229-14-167.
16. McDevitt, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. . American Society for Microbiology. 9p.

17. Nakei, M. D., Venkataramana, P. B. and Ndakidemi, P. A. (2022). Soybean-Nodulating Rhizobia: Ecology, Characterization, Diversity, and Growth Promoting Functions. Frontiers. 6:23p.
18. Oryakhil, Q., Irfan, M. A. (2020). Morphological Biochemical And Plant Growth Promoting Charac terization Of Rhizobia Isolated From Root Nodule Of Cicer Arietinum. Tropical Agroecosystems (TAEC). 1(2): 59-63
19. Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E. M. H., Stougaard, J. (2007). LysM domains mediate lipochitin – Oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. The EMBO Journal, 26(17), 3923–3935. https :// doi.org/10.1038/sj.emboj.7601826.
20. Shamseldin, A. (2013). The Role of Different Genes Involoved in Symbiotic Nitrogen Fixation – Review. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. 8 (4): 84-94.
21. Shamseldin, A., Abdelkhalek, A. and Sadowsky, M. J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. Symbiosis.71: 91–109.
22. Walker L., Lagunas B. and Gifford M. L. (2020). Determinants of Host Range Specificity in Legume-Rhizobia Symbiosis. Frontiers in Microbiology. 11: 585749.
23. Wang, E.T. (2019). Symbiosis Between Rhizobia and Legumes. Ecology and Evolution of Rhizobia Principles and Applications. pp 3-19.
24. Weir, B. (2006). Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia. Phd. The University of Auckland. 223.
25. Wubie, G. and Adal, M. (2021). Isolation and characterization of chickpea (Cicer arietinum L.) nodulating rhizobia collected from south wollo zone, Ethiopia. International journal of agronomy. P11.
26. Zhang X. X. ; Turner, S. L. , Guo, X. W., Yang, H.-J. , Debellé, F. , Yang, G.P. ; Dénarié, J. , Peter, J., Young, W. and Li, F. D. (2000). The Common nodulation genes of Astragalus sinicus Rhizobia Are Conserved despite Chromosomal Diversity. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. p. 2988–2995.