

## عزل طافرات جراثيم *Sinorhizobium meliloti* قادرة على تحمل الملوحة العالية والتعايش مع النبات البقولي بشكل أفضل بإستعمال الأشعة فوق البنفسجية

باسل عبد الزهرة عباس<sup>1</sup> جبار دهري نعمه<sup>2</sup> غصون فاضل راضي<sup>2</sup>

<sup>1</sup> جامعة البصرة، كلية الطب البيطري

<sup>2</sup> جامعة البصرة، كلية العلوم

القبول 2010/10/11

الإستلام 2010/4/4

### الخلاصة

تم عزل جرثومة *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنبات الجت ودرست خواصها العامة وأجري التلقيح التجريبي على النبات ذاته. ثم تم إختبار قابلية العزلات على النمو في تراكيز مختلفه من أملاح كلوريد الصوديوم و كبريتات البوتاسيوم وتم حساب التركيز المثبط الأدنى للنمو. بعدها تم تطفير العزلات التي أبدت مقاومة أعلى للملوحة بوساطة إستعمال الأشعة فوق البنفسجية وتبين ظهور عزلات مختلفة مظهرياً عن العزلة الأبوية ولها القابلية للنمو في تراكيز عالية من الملوحة تصل إلى 10% كلوريد الصوديوم و 12% كلوريد البوتاسيوم إلا أنها لم تختلف عن العزلة الأبوية في قابليتها للنمو بظروف مختلفة من الدالة الحامضية. كما كانت هناك اختلافات واضحة بالنسبة للنباتات الملقحة بالعزلات المطفرة حيث كانت الأفضل من ناحية عدد العقد الجذرية وأرتفاع النبات والوزن الجاف للجزء الخضري ومحتوى النتروجين بالمقارنة مع العزلة الأبوية. وقد إمتازت العزلتان المطفرتان أيضاً بإختلافات واضحة في مقاومتها للمضادات الحيوية عن العزلة الأبوية.

## ISOLATION OF *SINORHIZOBIUM MELILOTI* MUTANTS HAVE HIGH ABILITY FOR SALT TOLERANCE AND ENHANCED SYMBIOSIS WITH ALFALFA PLANTS

Basil A. Abbas<sup>1\*</sup> Jabbar D. Neama<sup>2</sup> Ghosoon F. Radhi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Basrah, College of Veterinary Medicine

<sup>2</sup>University of Basrah, College of Sciences

Received 4/4/2010

Accepted 11/10/2010

### ABSTRACT

This study involves the isolation of *Sinorhizobium meliloti* strains from root nodules of alfalfa plants. The general characteristics of the bacteria were studied and the artificial infection was observed on the plants. The ability of the strains for growth on different concentrations of NaCl and K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salts were recorded. The strains that showed ability to grow on lowest inhibition concentrations were subjected to UV mutagenesis. The results showed that two mutants were obtained which have different characteristics than parental strain and have ability to grow at high concentration of salts reached 10% NaCl and 12% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> but it showed no differences regarding growth at different pH value. Plants inoculated with mutant strains were better than that inoculated with parental strain in respect of nodule number, plant height, shoot dry weight and total nitrogen content. The mutant strains also showed differences in antibiotics resistance than parental strain.

Key words: *Sinorhizobium meliloti*, Alfalfa, Salt tolerance, UV mutagenesis

---

\*To whom correspondence should be addressed (E-mail: [basilabbas63@yahoo.com](mailto:basilabbas63@yahoo.com))

## المقدمة

يعد النتروجين الجوي المصدر الأساس للنتروجين في البروتينات والأحماض النووية والمكونات النتروجينية الحيوية الأخرى في جميع الخلايا الحية. وتمتلك بعض الكائنات الحية بدائية النواة القدرة على تحويل غاز النتروجين إلى أمونيا، ويطلق على هذه العملية بتثبيت النتروجين حيويًا Biological Nitrogen Fixation، وإن 90% من النتروجين المضاف إلى التربة يأتي طبيعياً عن طريق التثبيت الحيوي بوساطة أنواع معينة من الجراثيم والطحالب الخضراء المزرقمة Cyanobacteria والفطريات الشعاعية والأوالي الحيوانية، إذ تحول النتروجين الجوي إلى أمونيا. تعدّ الملوحة والدالة الحامضية من العوامل البيئية المهمة ذات التأثير الفعال على معدل بقاء الرايزوبيا في التربة ويعدّ نبات الجت (*Medicago sativa* L.) من أهم المحاصيل البقولية العلفية ويستمر لمواسم عديدة وإحتوائه على كمية كبيرة من البروتين فضلاً عن دوره المهم في تحسين وخصوبة التربة. تقدر كمية النتروجين التي يثبتها الجت في التربة حوالي 125-335 كغم N/هكتار سنوياً (1). يعد الإشعاع من أهم العوامل الفيزيائية التي توظف في مجال التطهير، سيما الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet rays باستخدام مصابيح خاصة تعطي إشعاع بطول موجي يقترب من 260 نانومتر هذا فضلاً عن خاصيتها المميّنة وطيفها الامتصاصي المميز للقواعد النتروجينية أو النيوكليوتيدات (2).

أجريت العديد من الدراسات الوراثية على جراثيم الرايزوبيا ومن ضمنها سلالة *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 إذ وجد أن التركيب الوراثي لها يحتوي على كروموسوم وإثنين من البلازميدات الكبيرة (Megaplasmid) هما pSymA و pSymB (3,4). يلعب سطح خلية الرايزوبيا دوراً كبيراً ومهماً في إصابة النبات البقولي (النبات المضيف) وتثبيت النتروجين، إذ يتكون سطح الخلايا من Exopolysaccharides (EPS) و Lipopolysaccharides (LPS) و Capsular polysaccharides (KPS) و Exopolysaccharides (EPS) و Cyclic  $\beta$ glucans (5). وتشير بعض الدراسات إلى أهمية exopolysaccharides في إصابة النبات وتكوين العقد الجذرية، وهناك العديد من الجينات المسؤولة عن بناء exopolysaccharides محمولة على Megaplasmid في جرثومة *S. meliloti* (6). وإن حدوث طفرات وراثية في هذه الجينات في جرثومة *Rleguminosarum* bv. *Trifolii* يؤدي إلى تكوين عقد جذرية غير فعالة على النباتات المتعايشة معها، ويشترك الجينان *pssA* و *pssCDE* في بناء EPS في جرثومة *R.leguminosarum* bv. *trifolii* (7,8). نظراً لأرتفاع نسبة الملوحة وخاصة في المناطق الجنوبية من العراق فقد هدفت الدراسة الى عزل جراثيم *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنبات الجت ومن مواقع مختلفة ولغرض إيجاد عزلات مقاومة للملوحة بواسطة التطهير .

### المواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية: جُمعت عدد من نباتات الجت من مناطق مختلفة في محافظة البصرة وعزلت جراثيم *Sinorhizobium meliloti* منها وتم تشخيصها على أساس صفاتها المظهرية وإمكانية إصابتها لنبات الجت ثانية كما تم اختبار قابليتها على تحمل تراكيز مختلفة من ملحي كلوريد الصوديوم وكبريتات البوتاسيوم وحسب ما ذكر في عباس وآخرون (9).

### تطهير العزلة *Sinorhizobium meliloti* الأبوية بإستعمال الأشعة فوق البنفسجية

أُتبعَت طريقة Yamad وآخرون (10)، إذ أُستعمل مصباح الأشعة فوق البنفسجية نوع Penry lamp والذي يعطي إشعاعاً بطول موجي 253-265 نانوميتر، إذ وضع 5 مليلتر من المعلق لبعض عزلات *S. meliloti* الأكثر تحملاً للملوحة في طبق بتري معقم و شعع في الظلام على بعد 30 سم من مصدر الأشعاع و للأوقات 15، 10، 5، 4، 3، 2، 1، 20 دقيقة، وبعد إنتهاء مدة التشعيع غُلفت الأطباق بورق الألمنيوم المعقم وتُركت لمدة 3 دقائق بعدها أُخذ 1 مليلتر من المعلق المشع ثم زرع على وسط خلاصة الخميرة والتربتون (TY) الصلب وحضنت في الحاضنة على درجة حرارة  $28 \pm 2$  م لمدة 7 أيام، كما أُخذ 1 مليلتر من المعلق الأصلي غير المطفر، وعملت تخافيف ( $10^{-1}$  و  $10^{-2}$  و  $10^{-3}$ ) وأخذ من كل تخفيف 0.1 مليلتر وزرع على الوسط الزرعي TY وحضنت على درجة حرارة  $28 \pm 2$  م لغرض حساب عدد الخلايا الكلي (10). وتم إعتقاد المعادلة الآتية لحساب نسبة القتل:

$$\text{نسبة القتل \%} = \frac{\text{عدد الخلايا الحية الكلي قبل التطهير / مليلتر} - \text{عدد الخلايا الحية بعد التطهير / مليلتر}}{\text{عدد الخلايا الحية الكلي قبل التطهير / مليلتر}} \times 100$$

### انتخاب الجراثيم المطفرة

تم إنتخاب الجراثيم المطفرة وذلك من خلال إختبار قدرة نموها على الوسط الزرعي المحتوي على ملح كلوريد الصوديوم أو كبريتات البوتاسيوم بالتراكيز 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 10.5، 11، 12، 12.5%. كما أُختبرت الصفات الآتية للجراثيم المطفرة وحسب ما ذكر عباس (11).

- 1- قابلية العزلات المطفرة على إنتاج Cyclic  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3) glucans
- 2- قابلية العزلات المطفرة على إنتاج الياف السليلوز ( Cellulose fibrils )
- 3- قابلية العزلات المطفرة على الحركة بإنتاج Cyclic  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  2) glucans
- 4- قابلية العزلات المطفرة على إصابة النبات و تكوين العقد الجذرية .
- 5- قابلية نمو العزلات المطفرة على تراكيز مختلفة من المضادات الحيوية.
- 6- تأثير الدالة الحامضية (pH) في نمو العزلات المطفرة.

## تقدير محتوى النتروجين في النبات

تم هضم الجزء الخضري للنباتات المجففة بإستعمال حامضي الكبريتيك المركز و البيركلوريك وحسب طريقة Cresser و Parsons (12). وبعد الحصول على العينات المهضومة أُستعملت في تقدير محتوى النتروجين بإستعمال جهاز كدال وحسب طريقة Bremner (13).

## النتائج والمناقشة

## الطفرات المستحثة بالأشعة فوق البنفسجية UV

أنتخبنا إحدى العزلات المطفرة الأكثر مقاومة للملوحة من بين الجراثيم المعزولة (*S. meliloti* 18)، وبعد تكرار عملية التطهير لعدة مرات وعلى مدد زمنية مختلفة لوحظ ظهور عزلتين من الجراثيم المطفرة، هما *S. meliloti* 18A و *S. meliloti* 18B في المدتين 2 و3 دقيقة من التشعيع على التوالي لهما القدرة على النمو في وسط TY المحتوي على تركيز ملحي أعلى مما تتحمله العزلة الأبوية يصل إلى 10% من كلوريد الصوديوم أو 12% من كبريتات البوتاسيوم وحسب الجدولين (1،2).

جدول (1) : مقارنة بين العزلة الأبوية والعزلتين المطفرتين بوساطة الأشعة فوق

البنفسجية من ناحية تحملها لتراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم NaCl

العزلات	النمو بتركيز ملح كلوريد الصوديوم %									
	10.5	10	9	8	7	6	5	4	3	2
العزلة الأبوية Sm18	-	-	-	-	-	W	+	+	+	+
العزلة المطفرة Sm18A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
العزلة المطفرة Sm18B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sm\* = *S. meliloti* ، + = نمو جيد ، - = عدم وجود نمو ، W = نمو ضعيف

جدول (2): مقارنة بين العزلة الأبوية والعزلتين المطفرتين بوساطة الأشعة فوق

البنفسجية من ناحية تحملها لتراكيز مختلفة من ملح كبريتات البوتاسيوم K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

العزلات	النمو بتركيز ملح كبريتات البوتاسيوم %											
	12.5	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
العزلة الأبوية Sm18	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
العزلة المطفرة Sm18A	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
العزلة المطفرة Sm18B	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sm\* = *Sinorhizobium meliloti* ، + = نمو جيد ، - = عدم وجود نمو

أظهرت العزلتين المطفرتين قدرة على تحمل تراكيز ملحية أعلى مما تتحمله العزلة الأبوية، كما بلغت نسبة الحصول على طفرة مقاومة للملوحة  $10 \times 4.3 - 5$  من المجموع الكلي للخلايا، أما نسبة القتل فبلغت 99.99184%، 99.99815% و 99.99869% في الأوقات 1 و 2 و 3 دقيقة على التوالي و 100% في الأوقات الأخرى الجدول (3).

جدول (3) : نسبة القتل والتطهير للعزلة الأبوية 18 *Sinorhizobium meliloti* بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية

تكرار الطفرة	عدد الخلايا الطافرة والمتمثلة للملوحة	نسبة القتل %	معدل عدد الخلايا الحية بعد التطهير في 1 مليلتر	عدد الخلايا الكلي في 1 مليلتر من المزرعة	مدة التعرض لأشعة (UV) (بالدقيقة)
0	0	99.99184	187.5	$10^6 \times 2.3$	1
0.024	1	99.99815	42.5	$10^6 \times 2.3$	2
0.033	1	99.99869	30	$10^6 \times 2.3$	3
0	0	100	0	$10^6 \times 2.3$	20,15,10,5,4

#### الصفات المظهرية والفسلجية للعزلتين المطفرتين

لوحظ من النتائج ظهور إختلاف في شكل العزلتين المطفرتين بعد تنميتها على الوسط الزرع TY وبعد مدة حضن لمدة أربعة أيام وبدرجة حرارة  $28 \pm 2$ م ظهر النمو للعزلتين المطفرتين أقل لزوجة من النمو للعزلة الأبوية، كما موضح في الصورة 1 (A و B)، كما أختبرت قدرة العزلتين المطفرتين على إنتاج Cellulose fibrils و  $\beta$ -(1→3)glucans Cyclic، وتبين عدم إمكانية العزلتين المطفرتين على إنتاج مادة (1→)-Cyclic  $\beta$  3)glucans من خلال ظهور اللون الأبيض في حين كانت قادره على إنتاج مادة Cellulose fibrils وذلك من خلال ملاحظة لونها الأحمر، كما أثبتت العزلتين المطفرتين قدرتهما على الحركة وكانت في جميع هذه الصفات مشابه للعزلة الأبوية، الجدول (4).



صورة (1): الشكل المظهري للعزلة الأبوية 18 *Sinorhizobium meliloti* (A) النمو قبل التطهير (B) النمو بعد التطهير

جدول (4): بعض خواص جرثومة *Sinorhizobium meliloti* الأبوية والمطفرة

رقم العزلة	التصبغ بصبغة congo red	التصبغ بصبغة aniline blue	الحركة
Sm18	+	-	+
Sm 18A	+	-	+
Sm 18B	+	-	+

**Sm18A**، **Sm18** = تشير إلى العزلة الأبوية، **Sm\*** = *Sinorhizobium meliloti* ، **Sm18** = تشير إلى العزلة الأبوية، **Sm18A**

= تشير إلى العزلة المطفرة **A**، **Sm18B** = تشير إلى العزلة المطفرة **B**

كما إن مظهر المستعمرات المطفرة القليل للزوجة الذي لوحظ في الدراسة قد يكون ناتجاً عن تغير حصل في تركيب متعدد السكريات الخارجية (Exopolysaccharide II) أو galactoglucan الموجودة في سطح الخلية الجرثومية فقد وجد أن *S. meliloti* لها القدرة على إنتاج نوعين مختلفين من Exopolysaccharides هما succinoglycan (EPSI) و galactoglycan (EPS II) ولوحظ أن إنتاج EPS II يمنح المستعمرات المظهر اللزج (14،15)، كما أن سلالة *S. meliloti* EFBI المتحملة للملوحة إستطاعت النمو على وسط زرعي يحتوي 300 مليمول/لتر كلوريد الصوديوم، ورافق ذلك نقصان في إنتاج EPS II نتيجة لزيادة تركيز ملح كلوريد الصوديوم ومن هنا يُستنتج أن EPS II تنظم بوساطة كلوريد الصوديوم في *S. meliloti* وأشار إلى حدوث تغير في تركيب Polysaccharide بتغير تركيز الملح (16).

#### إختبار قدرة العزلتين المطفرتين على إصابة النبات وتكوين العقد الجذرية

توضح الصورة (2) نجاح إصابة العزلتين المطفرتين للنبات العائل وتكوين العقد الجذرية عليه بعد مرور إسبوعين من التلقيح وبلون وردي ومتوسطة الحجم ومتمركزة في الجزء العلوي من الجذر مما يدل على إن الطفرات المستحثة لم تؤثر على قابلية البكتريا على إحداث الإصابة وحث النبات على تكوين العقد الجذرية.



صورة (2): تكوين العقد الجذرية على جذور نبات الجت الملقح بالعزلات المطفرة بوساطة ال UV لجرثومة *Sinorhizobium meliloti* بعد مدة إسبوعين من التلقيح

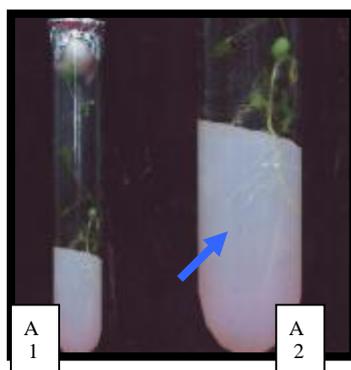
مقارنه النباتات الملقحة بجراثيم *Sinorhizobium meliloti* الأبوية والنباتات الملقحة بالعزلتين المطفرتين أظهرت نتائج الجدول (5) وجود اختلافات واضحة عند مقارنة العزلتين المطفرتين مع العزلة الأبوية في متوسط الوزن الجاف للجزء الخضري ومتوسط عدد العقد الجذرية المتكونه على جذور كل نبات فضلاً عن متوسط الوزن الجاف للعقد الجذرية ومتوسط ارتفاع النبات، وقد لوحظ أن العزلة المطفرة *S. meliloti* 18B قد فاقت بفارق معنوي وعند مستوى احتمال  $P < 0.05$  بالنسبة لمتوسط عدد العقد ومتوسط ارتفاع النبات وعند مستوى احتمال  $P < 0.01$  بما يتعلق بمتوسط الوزن الجاف للجزء الخضري ومتوسط الوزن الجاف للعقد على العزلة الأبوية *S. meliloti* 18، في حين لم تظهر النتائج أي فروقات معنوية من ناحية عدد التفرعات للعزلات الثلاثة، وتبين أن أعلى معدل لمتوسط عدد العقد بلغ 16.86 عند التلقيح بالعزلة *S. meliloti* 18B في حين كان أقل معدل لمتوسط عدد العقد 7.71 عند التلقيح بالعزلة الأبوية وكذلك الحال بالنسبة لمتوسط الوزن الجاف للجزء الخضري ومتوسط الوزن الجاف للعقد ومتوسط ارتفاع النبات، إذ بلغ أعلى معدل لهم 0.033غم و 0.0075غم و 15.57 سم على التوالي عند التلقيح بالعزلة *S. meliloti* 18B. أما بالنسبة للعزلة المطفرة *S. meliloti* 18 A فقد تفوقت معنوياً وعند مستوى احتمال  $P < 0.01$  على العزلة الأبوية بما يتعلق بمتوسط الوزن الجاف للجزء الخضري وبارتفاع النبات، كما في الصورة (3،4). وأوضح Payakapong وآخرون (17) في دراسته أن سلالة *Sinorhizobium sp.* BL3 المعزولة من العقد الجذرية لنبات الفاصوليا كانت تتحمل ملوحة أعلى من 600 ملليمول/لتر كلوريد الصوديوم وفعالة في تثبيت النتروجين ومن خلال الدراسات الوراثية عليها وجد أنها تحتوي على مجموعتين من الجينات إذ تحمل الأولى الجينات المسؤولة عن إنتاج البروتينات الخاصة بإنزيم ATPase، بينما البروتينات المنتجة بواسطة جينات المجموعة الثانية تشابهت لدرجه كبيرة مع إنزيمات تتطلب في بناء حامض كلايسين بيتين (glycin betaine) في جرثومة *S. meliloti* وأكد ذلك من خلال نقل هذه المجموعتين من الجينات الى *Rhizobium* او *Bradyrhizobium* الحساسه للملوحة ادى الى منح هذه الجرثومة المقاومة للملوحة العالية.

جدول (5): مقارنة بين النباتات الملقحة بجراثيم *Sinorhizobium meliloti* الأبوية والعزلتين المطفرتين

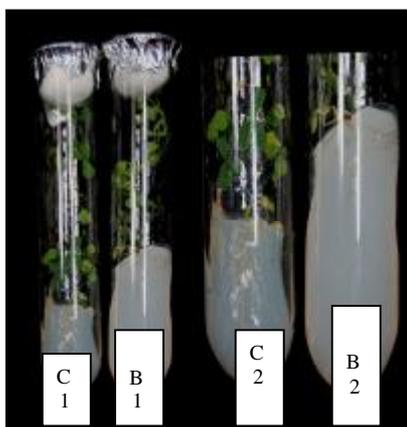
رقم العزلة	متوسط ارتفاع النبات (سم)	متوسط عدد التفرعات	متوسط الوزن الجاف للجزء الخضري (غرام/نبات)	متوسط عدد العقد/نبات	متوسط الوزن الجاف للعقد (غرام/نبات)
العزلة الأبوية Sm18	<sup>b</sup> 12.64	2.71	<sup>b</sup> 0.017	<sup>b</sup> 7.71	<sup>b</sup> 0.0042
العزلة المطفرة Sm18A	<sup>ab</sup> 14.85	2.86	<sup>a</sup> 0.026	<sup>ab</sup> 12.86	<sup>ab</sup> 0.0061
العزلة المطفرة Sm18B	<sup>a</sup> 15.57	3	<sup>a</sup> 0.033	<sup>a</sup> 16.86	<sup>a</sup> 0.0075
	*	N.S	**	*	**

*Sinorhizobium meliloti* = Sm\* ، N.S = لا يوجد فرق معنوي ، \*\* = وجود فرق معنوي لتأثير

العزلات بمستوى احتمال 0.01 ، \* = وجود فرق معنوي لتأثير العزلات بمستوى احتمال 0.05



صورة(3) :نبات الجت ( *Medicago sativa L.* ) الملقح بجرثومة *Sinorhizobium meliloti* الأبوية A1 = قبل التكبير A2 = بعد التكبير



صورة (4):نبات الجت الملقح بالعزلتين المطفرتين لجرثومة *Sinorhizobium meliloti* (B1,B2) الملقحة بعزلة *S.meliloti* 18A المطفرة ، (C1,C2) = الملقحة بعزلة *S.meliloti* 18B المطفرة

#### تأثير الدالة الحامضية في نمو العزلات المطفرة والأبوية

تبين خلال إختبار نمو العزلتين المطفرتين *S. meliloti* 18A ، *S. meliloti* 18B على مدىات مختلفة من أن هاتين العزلتين لم تظهراً نمواً على الوسط الزراعي ذا رقم هيدروجيني 4 ، أما بالنسبة للوسط الزراعي ذا رقم هيدروجيني 5 فنمت عليه العزلة المطفرة *S. meliloti* 18A بصورة ضعيفة ولم تظهر العزلة المطفرة *S. meliloti* 18B أي نمو، وبارتفاع القم الهيدروجيني (من 10 → pH=6) نمت كلتا العزلتين المطفرتين وكذلك الحال بالنسبة للعزلة الأبوية *S. meliloti* 18A لم تظهر نمواً في رقم هيدروجيني 4 ونمت على الأوساط الزراعية ذات الأرقام الهيدروجينية المرتفعة (من 10 → pH=5) ولكن النمو كان ضعيفاً بالنسبة للرقم الهيدروجيني 5 الجدول(6). وتدل هذه النتائج على إحتمالية عدم حصول تغير في الجينات المسؤولة عن الرقم الهيدروجيني.

جدول(6): مقارنة تأثير الدالة الحامضية في نمو العزلات المطفرة والأبوية

الرقم الهيدروجيني							العزلة
1	9	8	7	6	5	4	
0							
+	+	+	+	+	W	-	Sm18
+	+	+	+	+	W	-	Sm18A
+	+	+	+	+	-	-	Sm18B

= Sm18B = Sm18A = تشير إلى العزلة المطفرة A، = تشير إلى العزلة الأبوية، Sm18 = تشير إلى العزلة الأبوية، Sm18A = تشير إلى العزلة الأبوية، Sm18B = تشير إلى العزلة المطفرة B، W = تشير إلى النمو الضعيف، - = تشير إلى عدم وجود نمو، + = تشير إلى النمو الجيد

## قابلية نمو العزلات المطفرة والأبوية على تراكيز مختلفة من المضادات الحيوية

يوضح الجدول(7) قابلية نمو العزلات المطفرة والأبوية على الأوساط الزرعية المحتوية على المضادات إذ نمت على الوسط الزرعي المحتوي على المضاد Erythromycin بتركيز 400 مايكروغرام/ملييلتر في حين لم تظهر أي نمو على الوسط الزرعي المحتوي على المضاد Streptomycin بتركيز 50 مايكروغرام/ملييلتر، بينما أظهرت اختلافات في نموها على مضادات الحيوية الأخرى فقد نمت العزلة الأبوية على الوسط المحتوي على المضاد Amoxicillin بالتركيزين 50 و200 مايكروغرام/ملييلتر، أما بالنسبة للعزلتين المطفرتين لم تظهر أي نمو في التركيزين ذاتهما وكذلك بالنسبة للمضاد Chloramphenicol، إذ نمت العزلات المطفرة والأبوية على الوسط المحتوي عليه بالتركيزين 50 و100 مايكروغرام/ملييلتر، في حين لم تتم العزلتين المطفرتين في التركيز 200 مايكروغرام/ملييلتر.

جدول (7): قابلية نمو العزلات الأبوية والمطفرة على النمو بوجود المضادات الحيوية

gentamicin مايكروغرام/ ملييلتر		Ampicillin مايكروغرام/ ملييلتر		Streptomycin مايكروغرام/ ملييلتر	Chloramphenicol مايكروغرام/ملييلتر			Amoxicillin مايكروغرام/ ملييلتر		Erythromycin مايكروغرام/ملييلتر				العزلات
200	50	100	50	50	200	100	50	200	50	400	200	100	50	
-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Sm18
+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	Sm18A
-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	Sm18B

= Sm18 = *Sinorhizobium meliloti* ، + = تشير إلى النمو ، - = تشير إلى عدم وجود نمو

أما المضادين Ampicillin و Gentamycin فتبين أن العزلة الأبوية 18 *S. meliloti* نمت بالتركيزين 50 و 100 مايكروغرام/مليتر للمضاد الحيوي Ampicillin وبالتركيز 50 مايكروغرام/مليتر للمضاد Gentamycin، وأظهرت العزلة المطفرة *S. meliloti* 18A قدرة للنمو على المضاد Ampicillin بالتركيز 50 مايكروغرام/مليتر وللمضاد Gentamycin بالتركيزين 50 و 200 مايكروغرام/مليتر، أما العزلة المطفرة *S. meliloti* 18B فلم تظهر نمواً على كلا المضادين في جميع التراكيز المذكورة. تبين مما سبق أن العزلتين المطفرتين بوساطة الأشعة فوق البنفسجية أظهرتا حساسية لبعض مضادات الحيوية بتركيز معينة مقارنة مع العزلة الأبوية وهذا ربما يعود إلى حدوث تغيير في التركيب الوراثي للعزلة الأبوية الذي قد يكون حصل في الجينات المحمولة على البلازميد أو الكروموسوم بالشكل الذي جعل هذه العزلات حساسة لهذه المضادات الحيوية (18).

#### تقدير محتوى النتروجين في النباتات

أن إختبار قدرة العزلتين المطفرة وكفاءتهما على تثبيت النتروجين الجوي بينت أن لهما تأثير إيجابي واضح على الصفات المدروسة للنباتات الملقحة بهما، وأضح ذلك من خلال الزيادة في أعداد العقد الجذرية الفعالة ووزنها الجاف وكذلك الوزن الجاف للجزء الخضري وارتفاع النبات قد تعزى الزيادة في الوزن الجاف إلى تنشيط الفعاليات الفسيولوجية الخاصة ببناء المركبات النتروجينية والمواد الغذائية الأخرى وان معظم النباتات الملقحة بالعزلتين المطفرتين كان لها محتوى نتروجينياً أعلى من النباتات الملقحة بالعزلة الأبوية (جدول 8). أن هذه الزيادة في تثبيت النتروجين قد تعود إلى التأثير المنشط لهذه الطفرات على بعض العمليات الخاصة بأبيض النتروجين أو تنشيط بعض الأنزيمات الخاصة بذلك (19). وقد أجريت دراسات في هذا الصدد منها دراسة المعاضيدي (20) إذ أشار إلى أن تعرض جرثومة *S. meliloti* إلى أشعة كاما بجرعة 5 كيلوراد أدى إلى أستحثاث عزلات محسنة من *S. meliloti* وكان لها تأثير إيجابي واضح على صفات النباتات إذ كانت نسبة الزيادة تتراوح بين 31-100% في عددالعقد الجذرية و 33-98% في الوزن الطري و 24-96% في الوزن الجاف و 34-56% في المحتوى الكلي للنتروجين وتشير الدراسة الحالية أن الزيادة في متوسط عدد العقد اقترنت بحدوث زيادة في متوسط وزنها الجاف، وهذا قد يدل على أن العقد كانت فعالة في تثبيت النتروجين وهذا يختلف مع ما ذكره سعيد (21) الذي لاحظ أن متوسط الوزن الجاف للعقد الفعالة يختلف باختلاف عدد العقد فالأعداد العالية اقترنت بأنخفاض متوسط وزن العقد والأعداد القليلة اقترنت بمتوسط عال للعقد الفعالة ويعزى ذلك الى وجود عدد قليل من العقد الفعالة على نبات الجت.

جدول (8): مقارنة بين محتوى النباتات من النتروجين الكلي للعزلات الأبوية والمطفرة

رقم العزلة	محتوى النتروجين ملغم/ نبات
العزلة الأبوية Sm18	0.11
العزلة المطفرة Sm18A	0.255
العزلة المطفرة Sm18 B	0.323
$5.1 = X^2$	

\*Sm = *Sinorhizobium meliloti*

## المصادر

- 1- قاسم، غياث محمد وعلي، مضر عبد الستار (1989). علم أحياء التربة المجهرية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل . 304 صفحة .
- 2- عثمان، احمد مصطفى والحجاج، محمد معارج ( 2006). الوراثة، كلية الطب البشري، جامعة دمشق . 489 صفحة .
- 3- Guo, X.; Flores, M.; Mavingui, P.; Fuentes, S. I.; Hernandez, G.; Davila, G. and Palacios, R.(2003). Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Gen. Res. J.*, 13:1810-1817.
- 4- Stiens, M.; Schneiker, S.; Keller, M.; Kuhn, S.; Pühler, A. and Schlüter, A.(2006). Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid pSmeSM11a; isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Appl. Environ. Microbiol. J.*, 72:3662-3672.
- 5- Kereszt, A.; Kiss, E.; Reuhs, B. L.; Carlson, R. W.; Kondorosi, A. and Putnoky, P.(1998). Novel *rpkK* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule : the *rpkK* gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, 180:5426-5431
- 6- Baldani, J. I.; Weaver, R. W.; Hynes, M. F. and Eardly, B. D.(1992). Utilization of carbon substrates, electrophoretic enzyme patterns, and symbiotic performance of plasmid-cured clover rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol. J.*, 58:2308-2314.
- 7- Rolfe, B. G.; Carlson, R. W.; Ridge, R. W.; Dazzo, F. B.; Mateos, P. F. and Pankhurst, C. E.(1996). Defective infection and nodulation of clovers by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* . *Aust. J. Plant Physiol.*, 23:285-303.
- 8- Pollock, T. J.; van Workum, W. A. T.; Thorne, L.; Mikolajczak, M. J.; Yamazaki, M.; Kijne, J. W. and Armentrout, R. W.(1998). Assignment of biochemical functions to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharides in *Sphingomonas* strain S88 and *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.*, 180:586-593.
- 9- عباس، باسل عبدالزهرة و نعمه، جبار دهري و راضي غصون فاضل (2010). عزل وتشخيص جرثومة *Sinorhizobium meliloti* المعايشة لنبات الجت مع دراسة تأثير الملوحة والأس الهيدروجيني عليها. مجلة ابحاث البصرة (قيد النشر)
- 10- Yamada, S.; Suenaga, H.; Doi, K.; Yoshino, S. and Ogata, S.(2003). Effects of U. V. dose on formation of spontaneously developing pocks in *Streptomyces azureus* ATCC14921. *Biosci. Biotechnol. Biochem. J.*, 67:797-802.
- 11- Abbas, B. A .(2001). Studies on auxotrophic mutants of sulfur-containing amino acids of *Sinorhizobium meliloti* . Ph.D. Thesis, Biosciences and Biotechnology . University of Roorkee, India . 101 Pp.
- 12- Cresser, M. S. and Parsons, J. W.(1979). Sulphuric-perchloric acid digestion of plant material for the determination of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium. *Analytic Chem. Acta. J.*, 109:431-436.

- 13- Bremner, J. M.(1970). Regular Kjeldahl methods. In: Methods of soil analysis (ed.s L. A. Page; R. H. Miller and D. R. and Keeney). 2<sup>nd</sup>ed. ASA. Inc. Madison, Wisconsin, U.S.A.
- 14- Leigh, J. A.; Signer, E. R. and Walker, G. C.(1985). Exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. J.*, 82:6231-6235.
- 15- Glazebrook, J. and Walker, G. C.(1989).Anovel exopolysaccharide can function in place of calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation on alfalfa. *J. Cell.*, 56:661-672.
- 16- Lloret, J.; Wulff, B. B. H.; Rubio, J. M.; Downie, J. A.; Bonilla, I. and Rivilla, R. (1998). Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti*. *EFBI. Appl. Environ. Microbiol. J.*, 64:1024-1028 .
- 17- Payakapong, W.; Tittabutr, P.; Teaumroong, N.; Boonkerd, N.; Singleton, P. W. and Borthakur, D. (2006). Identification of two clusters of genes involved in salt tolerance in *Sinorhizobium* sp.strain BL3. *Symb .J.*, 41:47-53.
- 18- Mycek, M. J.; Harvey, R. A.; Champe, P. C. and Fisher, B. D.(2000). Lippincott's illustrated reviews: pharmacology. 2<sup>nd</sup> ed.Lippincott .Williams and Wilkins. New York. 513 Pp.
- 19- السعدي، عدويه عبد الله (1978). تأثير التلقيح ببعض الطفرات الوراثية المعزولة من مجموعة رايزوبيا اللوبياء على نمو نبات الماش. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد. 119 صفحة .
- 20- المعاضيدي، جبار فرحان (1988). استحداث طفرات في تكوين العقد الجذرية و تثبيت النايتروجين الجوي في بكتريا *Rhizobium meliloti*. مجلة بحوث علوم الحياة، 19 (3) : 599- 610 .
- 21- سعيد، مازن فيصل (1980). تواجد واعداد بكتريا العقد الجذريه في بعض المناطق الشماليه وكفاءتها في تثبيت النتروجين الجوي . رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الموصل. 112 صفحة .