Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 1, 2021 (141-157)

Isolation and Diagnosis of Rhizobium Bacteria Isolated from The Root Nodules of Leguminous Plants and Studying Their Plasmid Content.

Wisam Jihad Hisyan [*1], Mohammed Abdelilah Al- Shakarchi [2]

[1, 2] Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: [1*] basemweasam@gmail.com , [2] dr.mohammedsh@uomosul.edu.iq

(Received July 29, 2020; Accepted October 04, 2020; Available online March 01, 2021)

DOI: 10.33899/edusj.2020.127846.1098, © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract

The study included thirty-six isolates of rhizobia bacteria were isolated from the nodules located on the roots of nine types of leguminous family plants that were planted in four areas of the city of Mosul for the winter agricultural season for the year 2020-2019, where they studied the phenotypic and agricultural characteristics of the isolated bacteria in addition to a study of resistance and sensitivity to the isolates of rhizobia bacteria. The study included ten antibiotics, and resistance ratios differed between isolates groups, where the highest resistance rate for residual bacteria isolates was 100% for Nystatin and Amoxicillin, and the lowest resistance was for Tetracycline and Streptomycin, as it reached 22.2%. As for the rest of the antibiotics, there is a difference between that. As for heavy metal salts, all the isolates of rhizobia bacteria under study were resistant to both $CdCl_2$ chloride and $CoCl_2$ cobalt by 100%, while their resistance to nickel chloride $NiCl_2$ was 77.7% and the lowest resistance to heavy metal was mercury chloride $HgCl_2$, reaching 33.3%. The plasmid DNA content was described for the studied isolates, as the results showed that there are two types of plasmid DNA bundles, the first type close to large-scale gel drilling called Mega plasmid represents symbiotic plasmids that carry the genes of contract formation and nitrogen fixation and the second type moves far from the gel drilling and they are sizes small equal representing non-symbiotic plasmids.

Keywords: *Rhizobium*, Symbiosis ,Antibiotics , Heavy Metals , Plasmids.

عزل وتشخيص بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية ودراسة محتواها البلازميدي

وسام جهاد حسيان [*1] و محمد عبدالاله الشكرجي [2]

قسم علوم الحياة, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل, الموصل, العراق [2,1]

الخلاصة

تضـمنت الدراسـة عزل سـتة وثلاثين عزلة لبكتيريا الرايزوبيا من العقد الموجودة على جذور نباتات البرسـيم والجت والحلبة والعدس والحمص والباقلاء والفاصـولياء والبازلاء واللوبيا التي تمت زراعتها في اربعة مناطق من مدينة الموصـل للموسـم الزراعي الشتوي لسنة 2019–2020. درست الصفات المظهرية والزرعية للبكتيريا المعزولة إضافة لدراسة مقاومة وحساسية عزلات بكتيريا الرايزوبيا المشـمولة بالدراسـة لعشـرة مضـادات حيوية واختلفت نسـب المقاومة بين مجاميع العزلات حيث كانت أعلى نسـبة مقاومة 100% للمضـادين Nystatin وAmoxicillin واقل نسـبة مقاومة 22.2% للمضـادين Tetracycline و Streptomycin اما

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

بقية المضادات الحيوية فتفاوتت مابين ذلك. اما بالنسبة لاملاح المعادن الثقيلة فقد كانت جميع عزلات بكتيريا الرايزوبيا قيد الدراسة مقاومة لكل من كلوريد الكادميوم $CdCl_2$ وكلوريد الكوبلت $CoCl_2$ وبنسبة 100% في حين كانت نسبة مقاومتها لكلوريد النيكل $NiCl_2$ 77.7% وكانت اوطأ نسبة مقاومة للمعدن الثقيل كلوريد الزئبق$HgCl_2$ 33.3%. بينت نتائج توصيف المحتوى البلازميدي للعزلات المدروسة وجود نوعين من حزم الـ DNA البلازميدي النوع الاول قريب من حفر الهلام كبير الحجم يدعى Mega plasmid يمثل البلازميدات التكافلية والنوع الثاني تحرك لمسافات بعيدة عن حفر الهلام وذات احجام صغيرة تمثل البلازميدات غير التكافلية.

كلمات مفتاحية : الرايزوبيوم ، العلاقة التعايشية ، المضادات الحيوية ، المعادن الثقيلة ، البلازميدات.

المقدمة

البقوليات Legumes هي نباتات تعود لعائلة الـ Fabaceae او Leguminaceae ذات الانتشار الواسع مقارنة بالعوائل النباتية الاخرى، وتعتبر مصدر الغذاء الاساسي بعد الحبوب وفي علم التصنيف التقليدي او الاعتيادي تعد ثالث اكبر عائلة نباتية من مغطاة البذور (النباتات الزهرية) (Angiosperms) اذ تشمل اكثر من 700 جنس و20,000 نوع، وهذه العائلة مقسمة الى ثلاث عوائل ثانوية (Subfamiliy): البقميةCaesalpinioideae والسنطاوية Mimosoideae والفراشية Papilionoideae، ولأفراد هذه العوائل الثانوية القدرة على تكوين علاقة تعايشية مع البكتريا المثبتة للنيتروجين الجوي والموجودة في العائلة الثانوية Papilionoideae وتمثل 90% من الاجناس المدروسة [1].

يطلق على البكتيريا المثبتة للنتروجين والتابعة لعائلة Rhizobiaceae التي تضم الاجناس التالية *Rhizobium, Bradyrhizobium, Mesorhizobium , Sinorhizobium , Allorhizobium*، مجتمعة تحت اسم *Rhizobia*، تعمل هذه البكتريا على تثبيت النتروجين عن طريق تكوين عقد في جذور النباتات البقولية [2]. تكون افراد هذه العائلة عبارة عن بكتيريا سالبة لصبغة كرام، هوائية واختيارية، عضوية التغذية [3] عصوية الشكل غير مكونة للسبورات تستوطن التربة تتواجد بشكل مفرد او بشكل ازواج وتتحرك باسواط محيطية او قطبية [4]. تنمو بشكل مستعمرات بيضاء لزجة على الاوساط الغذائية الصلبة الحاوية على خلاصة الخميرة Yeast extract وسكر المانيتول وبعض الاملاح غير العضوية كما تستخدم السكروز والكاربوهيدرات كمصدر للطاقة واليوريا والنترات والاحماض الامينية كمصدر للنتروجين ولها القدرة على احتمال تاثيرات مختلفة من الملوحة والـ pH ودرجة الحرارة المثلى لنموها تتراوح مابين (28-31 °م)[5].

في بعض أجناس الرايزوبيا مثل جنسي *Rhizobiun* و *Sinorhizobiun* تحتوي على جينات *nod* genes , *nif* genes و *fix* genes موجودة على بلازميد يطلق عليه البلازميد التكافلي Symbiotic plasmid ويطلق عادة على هذه البلازميدات الاكبر من 1Mb بـ Mega plasmids.

وجد ان هذه لبلازميدات تكون اقل حجماً وأكثر عدداً في كل من بكتريا *R. leguminosarum* السلالة 3841 و بكتيريا *R. etli* السلالة *CFN* 42 ، إضافة لاحتوائها على ستة بلازميدات والتي تمثل حوالي 40% من الجينوم الكلي الذي يصل حجمه الى 7.8Mb و 6.5Mb على التوالي. في كلتا السلالتين واحد من هذه البلازميدات يعتبر البلازميد التكافلي Symbiotic plasmid يحمل الجينات *nod* genes, *nif* genes و *fix* genes. وكذلك جينات اضافية غير تكافلية [1]. لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizohium* القدرة على مقاومة المضادات الحيوية والتي تمكنها من البقاء لفترة طويلة من الزمن في المحيط الجذري Rhizosphere. [6]، بالاضافة الى امكانيتها في نقل هذه المقاومة من جنس الى اخر فضلا عن امكانيتها في نقل المقاومة للمعادن الثقيلة عن طريق انتقال المادة الوراثية بالاقتران البكتيري Conjugation [7].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

تهدف الدراسة إلى عزل الانواع البكتيرية العائدة لجنس الـــ *Rhizobium* من بعض النباتات البقولية والمزروعة في اربعة مناطق من محافظة نينوى وتشخيص هذه الانواع المعزولة باستخدام الصفات المظهرية فضلاً عن الصفات البايوكيميائية لها واختبار التخصص العائلي للبكتريا للتأكد من نقاوة الانواع المعزولة وذلك بتكوين العقد على النباتات البقولية المتخصصة باصابتها مختبريا و ايجاد العلائم الوراثية (genetic markers) لهذه الانواع البكتيرية المعزولة كالمقاومة لكل من المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة، و التحري عن الـDNA البلازميدي في عزلات بكتريا الرايزوبيا.

مواد وطرائق البحث:

عزل بكتيريا الرايزوبيوم من العقد الجذرية للنباتات البقولية:

:Isolation of *Rhizobium* Bacteria from the Root Nodes of Leguminous Plants

عزلت بكتيريا الرايزوبيوم من العقد المتكونة على جذور النباتات البقولية المزروعة في اربعة مواقع من محافظة نينوى (وهي البيت السلكي التابع لقسم علوم الحياة وكذلك المزرعة الموجودة في منطقة الشمسيات ومنطقة يارمجة الغربية بالاضافة الى منطقة الرشيدية) ورمزت المناطق بالارقام (4,3,2,1) وبحسب المناطق التي اخذت منها العينات على التوالي، ولتسعة انواع من نباتات العائلة البقولية (البرسيم والجت والعدس والحلبة والباقلاء والحمص والفاصولياء والبازلاء واللوبيا)، فصلت العقد المتكونة على جذور النباتات البقولية مع اخذ جزء صغير من الجذر ثم غسلت بالماء الجاري للتخلص من الاتربة والمواد العالقة بها. غمرت بعدها في الكحول الاثيلي تركيزه 70% لمدة ثلاث دقائق بعد ذلك تم غسلها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ثم نقلت الى محلول هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl تركيزه (3:1 حجم /حجم) ماء/هايبوكلورايت الصوديوم وغمرت فيه لمدة 15 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم وبمعدل ثلاث مرات وبعد ذلك نقلت الى طبق بتري يحتوي على ورق ترشيح معقم لغرض تجفيف العقد من الماء العالق بها بعد ذلك تم نقل العقد الى وسط خلاصة الخميرة والمانيتول الصلب Yeast Extract Mannitol (YEMA) Agar (0.4:Yeast extract و 10:Mannitol و NaCl: 0.1 و$MgSO_4.7H_2O$: 0.2 و K_2HPO_4: 0.5 و 15:Agar) غرام /لتر ثم وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة (28±1)°م ولمدة 24 الى 48 ساعة وذلك لغرض التاكد من كفاءة عملية تعقيم العقد الجذرية [8].

نقلت العقد المعقمة إلى انابيب معقمة تحوي على 2 مل Yeast Extract Mannitol Broth (YEMB) السائل وسحقت باستخدام قضيب زجاجي معقم ومن ثم أخذت منه حملة لوب وفرشت بالتخطيط على طبق بتري يحتوي على وسط YEMA الصلب ثم وضعت الاطباق في الحاضنة عند درجة حرارة (28±1 °م) ولمدة 24 الى 48 ساعة حسب طريقة Graham [8]. اخذت عينات من المستعمرات النامية ودرست اشكال خلاياها وصفاتها المظهرية باستخدام صبغة كرام باستخدام Gram stain kit (Himedia) فحصت بالعدسة الزيتية (100x) للمجهر الضوئي المركب Vincent [9]. وصنفت البكتيريا المعزولة حسب المضيف النباتي الى تسعة مجاميع مع وضع رمز لكل مجموعة تم الحصول عليها من النباتات البقولية وكما مبينة بالجدول (1).

جدول رقم (1) المضيف النباتي والعزلات البكتيرية التي عزلت منها

المضيف النباتي	الجت	البرسيم	الحمص	العدس	الحلبة	الباقلاء	الفاصولياء	البازلاء	اللوبيا
رمز العزلة البكتيرية	RhS	RhM	RhA	RhC	RhG	RhV	RhPh	RhP	RhR

أجري اختبار التخصص العائلي لكل عزلة وذلك باخذ حملة لوب من المستعمرات المعزولة لتلقيح 50 مل من وسط YEM السائل باستخدام دوارق زجاجية ولمدة 48 ساعة ومن ثم طردت مركزيا للحصول على راسب من البكتريا. لقحت جذور النباتات البقولية التي بعمر 7–10 ايام النامية في الوسط الخالي من النتروجين (NF) وضبط الاس الهيدروجيني عند pH

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

6.6±0.2 باستخدام اللقاح البكتيري المعد من الخطوة السابقة وحسب طريقة Singh واخرون [13] للتاكد من مقدرة العزلة البكتيرية على تكوين العقد الجذرية على المضيف النباتي الخاص بها. حضر الوسط عن طريق اذابة المكونات المذكورة في الجدول رقم (2) في لتر من الماء المقطر ثم بعد ذلك عقم في جهاز المعقام وفق طريقة Fahraeus [10].

جدول رقم (2) مكونات وسط Nitrogen Free (NF)

المكونات	التركيز ملغم /لتر
$MgSO_4.7H_2O$	120
Na_2HPO_4	150
KH_2PO_4	100
$CaCl_2.2H_2O$	132
H_3BO_3	0.062
Fe citrate($FeC_6H_6O_7$)	0.05
$MnSO_4.2H_2O$	0.11
$ZnSO_4.7H_2O$	0.28
$CoCl_2.6H_2O$	0.024
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$NaMoO_4.2H_2O$	0.024
Agar	8000

وسط المعادن الثقيلة: Heavy Metal Medium

تم تحضير الوسط باضافة املاح المعادن الثقيلة($CoCl_2$,$CdCl_2$,$NiCl_2$,$HgCl_2$) المعقمة بالترشيح كلا على حدا الى وسط خلاصة الخميرة والمانيتول المعقم والمبرد الى درجة حرارة(45–50)°م وبالتراكيز المبينة في الجدول رقم (3)[11] .

جدول رقم (3): التراكيز الخزينة والنهائية لاملاح المعادن الثقيلة

ت	المعدن الثقيل	رمز المعدن	التركيز الخزين mg/ml	التركيز النهائي µg/ml	المذيب
1	كلوريد الزئبق	$HgCl_2$	25	25	ماء مقطر معقم
2	كلوريد النيكل	$NiCl_2$	25	25	ماء مقطر معقم
3	كلوريد الكادميوم	$CdCl_2$	25	25	ماء مقطر معقم
4	كلوريد الكوبلت	$CoCl_2$	25	25	ماء مقطر معقم

وسط اختبار المضادات الحيوية: Antibiotic Test Medium

حضر وسط الاكار المغذي وعقم بجهاز الاوتوكليف وبعد تبريد الوسط الى درجة حرارة (45–50)°م أضيف المضاد الحيوي الى الوسط وبتركيز نهائي مايكروغرام/ ملليتر والماخوذ من محلول الخزين لكل مضاد حيوي كما هو مبين في الجدول رقم (4) للمضادات الحيوية الخزينة والمذيبات الخاصة بها [12]. علما ان المضادات الحيوية تم الحصول عليها من شركة دار الدواء الاردنية Dar ALDawa (Jordan) (DAD) والشركة العامة لصناعة الادوية(سامراء / العراق). وتم تعقيم محاليل المضادات الحيوية الخزينة والنهائية بواسطة Filtre Sirynge بحجم (0.45µm).

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

جدول رقم (4): التراكيز الخزينة والنهائية للمضادات الحيوية

ت	المضاد الحيوي	الرمز	التركيز الخزين mg/ ml	التركيز النهائيµg/ml	المذيب
1	Chloramphenicol	Cm	5	30	ايثانول مطلق
2	Rifampicin	Rif	5	50	ميثانول 100%
3	Tetracycline	Tc	5	10	ايثانول70%
4	Nystatin	Nys	5	50	ايثانول70%
5	Ampicillin	Ap	5	50	ماءمقطر معقم
6	Erythromycin	Ery	10	15	ايثانول مطلق
7	Nalidixic acid	Nal	50	30	0.1N NaOH
8	Amoxicillin	Amo	5	50	ايثانول 70%
9	Streptomycin	Str	50	20	ماء مقطر معقم
10	Cefixime	Ce	5	50	ماء مقطر معقم

الاختبارات البايوكيميائية لعزلات بكتيريا الرايزوبيوم

Biochemical tests for Rhizobium Bacterial Isolates

استخدمت عدد من الاختبارات البايوكيميائية على الاجناس المختلفة من بكتيريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لعدد من النباتات البقولية قيد الدراسة وهي اختبار تسييل الجيلاتين Gelatin liquefaction Test تم من خلال نقل مستعمرة فتية من بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة الى انابيب اختبار تحتوي على وسط الجيلاتين وتحضينها بدرجة حرارة 28±1°م ولمدة 24-48ساعة [13]، واختبار الفلورة Fluorescence Testوالذي انجز بزراعة مستعمرات فتية من البكتيريا المعزولة ونشرها على وسط Kings Medium وتحضينها عند درجة حرارة 28±1°م ولمدة 24الى48 ساعة ويستدل من هذا الاختبار على قدرة البكتيريا على التالق الضوئي بعد تعرضها للاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 320nm وذلك حسب طريقة Singhواخرون [13]، اختبار انتاج انزيم اليوريز Urease Test حيث استخدم اكار اليوريا المعقم لزراعة مستعمرات فتية من عزلات بكتيريا الرايزوبيوم النقية وحضنت موائل الوسط بدرجة حرارة 28±1°م لمدة 24-48 ساعة وتم الاستدلال من تغير لون الدليل phenol red في الوسط من اللون الأصفر الى اللون الوردي على انخفاض pH الوسط فضلا عن قدرة هذه البكتريا على انتاج انزيم اليوريز ومن ثم تحويل اليوريا الى أمونيا [14]، اختبار الكاتاليز Catalase Test اجري هذا الاختبار عن طريق وضع مستعمرة فتية من بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة النقية على شريحة زجاجية نظيفة وبعد ذلك اضيف اليها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 تركيزه 3% حيث يدل ظهور فقاعات الغاز على النتيجة الموجبة للاختبار وقدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يحلل H_2O_2 الى H_2O و O_2 حسب طريقة Chhetri واخرون [15]، كذلك استخدم اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test عن طريق تلقيح وسط سيمون ستريت اكار Simmons Citrate Agar بمستعمرات فتية من عزلات بكتيريا الرايزوبيوم النقية في انابيب اختبار بشكل مائل وحضنت بدرجة حرارة 28±1°م لمدة 24-48 ساعة. حيث يدل تغير لون الوسط من اللون الاخضر الى اللون الازرق على قابلية بكتيريا الرايزوبيوم على استهلاك سترات الصوديوم بكونها مصدرا للكاربون مما ينتج عنه تحرر كاربونات الصوديوم التي تعمل على رفع الرقم الهيدروجيني pH وبدلالة تغير لون الدليل الى اللون الازرق[16]، تم الكشف عن مقدرة البكتيريا على انتاج انزيم الاوكسيديز من خلال اختبار Cytochrom Oxidase Test بوضع مستعمرة فتية من بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة بشكل نقي على ورقة ترشيح مبللة بعدة قطرات من كاشف الاوكسيديز حيث يدل ظهور اللون البنفسجي او الارجواني على قدرة البكتيريا على

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

انتاج انزيم Cytochrom Oxidase الذي يؤكسد الكاشف الى الناتج Indophenol حسب طريقة Wadhwa واخرون [16]، استخدم اختبار فوكس – بروسكر Voges-Proskuar Test بنقل مستعمرة فتية من عزلات البكتيريا قيد الدراسة النقية الى وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات وحضن الوسط بدرجة حرارة 1±28°م لمدة 24–48 ساعة. بعد ذلك تم اضافة 0.6ml من كاشف A (α-Naphthol) و0.2ml من كاشف B (KOH%40) ثم رجت الانابيب بشكل جيد وتركت لمدة 30 دقيقة حيث يدل ظهور اللون الاحمر على النتيجة الموجبة للاختبار نتيجة تكون المركب المتعادل 2,3Butanediol acetylmethyl carbinol acetion وفق طريقة Cappuccino وSherman [17]، اختبار المثيل الاحمر Methyl Red Test لقحت مجموعة من انابيب اختبار تحوي على وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات بمستعمرات فتية من عزلات بكتيريا الرايزوبيوم النقية وحضن الوسط بدرجة حرارة 1±28°م لمدة 48 ساعة بعدها اضيف اليه 5 قطرات من كاشف المثيل الاحمر حيث يدل تغير لون الوسط الى الاحمر او الوردي على قدرة البكتيريا على تخمير السكر وانتاج الحامض الذي يعمل على خفض الرقم الهيدروجيني pH الى اقل من 4.5 وتكون النتيجة موجبة للاختبار [18]، اختبار انتاج الاندولIndol Production Test حيث اجري هذا الاختبار بتلقيح وسط ماء الببتون بمستعمرات نقية من البكتيريا المعزولة وحضنت انابيب الاختبار عند درجة حرارة 1±28°م لمدة 24 ساعة. ثم اضيف اليه بعدها 5 قطرات من كاشف كوفاكس حيث يدل ظهور حلقة حمراء في اعلى طبقة الكحول على قابلية البكتيريا على انتاج الاندول من الحامض الاميني التربتوفان وهي نتيجة موجبة للاختبار [19]، اختبار القدرة على الحركة وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S عن طريق تلقيح وسط SIM شبه الصلب بمستعمرات فتية من العزلات البكتيرية النقية بطريقة الوخز بإبرة تلقيح معقمة ووضع الانابيب في الحاضنة عند 1±28°م لمدة 24–48 ساعة للكشف عن حركة البكتيريا حيث يدل انتشار النمو في الوسط على الحركة اما في حالة بقاء النمو في منطقة الوخز فيدل ذلك على عدم القدرة على الحركة. وللكشف عن غاز H_2S فان ظهور اللون الاسود في اسفل انابيب الاختبار يدل على قدرة البكتيريا على انتاج الانزيم Cysteine desulfurase الذي يحلل الحامض الاميني Cysteine ويحرر Hydrogen Sulfide [20].

عزل وتنقية محتوى الـ DNA البلازميدي من عزلات بكتيريا الـRhizobium باستخدام المواد الجاهزة المجهزة من قبل شركة Promega الامريكية

Isolation and purification of the plasmid DNA content from Rhizobium isolates using the ready-made materials prepared by Promega USA

رسبت الخلايا البكتيرية للمزرعة البكتيرية السائلة المنماة لمدة 24-48 ساعة باستخدام انبوب طرد مركزي (ابندورف) بحجم 1.5مل عن طريق اجراء عملية الطرد المركزي المبرد بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح بصورة كاملة. أضيف 100 مايكروليتر من محلول (I) الذي يتكون من 1 مل من 20% من محلول الكلوكوز المعقم بالترشيح، 0.5 مل من محلول 1M Tris-HCl (8 pH)، 0.8 مل من محلول 0.25 M EDTA (8 pH) المعقم، وأكمل الحجم الى 20 مل بالماء المقطر المعقم. وتم اعادة تعليق الراسب باستخدام جهاز المزج Vortex، ومن ثم أضيف اليه 200 مايكروليتر من محلول (II) الذي يتكون من 0.2 مل من محلول 10M NaOH، 1 مل من محلول 10% SDS المعقم، اكمل الحجم الى 10 مل بالماء المقطر المعقم. ومزجت الانابيب عن طريق تقليبها بهدوء عدة مرات وبدون استخدام جهاز Vortex. اضيف 150 مايكروليتر من محلول (III) الذي يتكون من 4.8 pH (3M Sodium acetae ($CH_3COONa\ 3H_2O$). ومزج بشكل مباشر عدة مرات كما هو موضح في الخطوة السابقة، ثم أجريت عليه عملية الطرد المركزي المبرد لمدة 10 دقائق وبسرعة 13000 دورة/دقيقة. نقل من الراشح 400 مايكروليتر الى انبوبة طرد مركزي جديدة بحجم 1.5 مل وأضيف إلى الراشح 0.8 مل من كحول الايثانول 95% ومزج عن طريق تقليب الانابيب ومن ثم ترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة خمسة دقائق.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

وأجريت عليه عملية الطرد المركزي وبسرعة قصوى (13000 دورة/دقيقة) لمدة 10دقائق وبعدها تم التخلص من الراشح المتكون من الايثانول، ثم غسل الراسب باستخدام 200 مايكروليتر من كحول الايثانول 70% ومزج بلطف ثم اجري له عملية الطرد المركزي لمدة 5 دقائق للتخلص من الايثانول. ثم بعد ذلك وضع الانبوب بصورة مقلوبة على ورق تنشيف للتخلص من بقايا الايثانول وترك الى ان جف الراسب بشكل تام، وعلق الراسب الذي يمثل البلازميدات باستخدام 50 مايكروليتر من محلول TE وحفظ لحين الاستخدام.

النتائج والمناقشة

الاختبارات التشخيصية لبكتيريا الرايزوبيا المعزولة المستخدمة في الدراسة

Diagnostic Tests For Rhizobia Isolated Bacteria Understudy

1- اختبار التخصص العائلي لعزلات بكتيريا الرايزوبيا

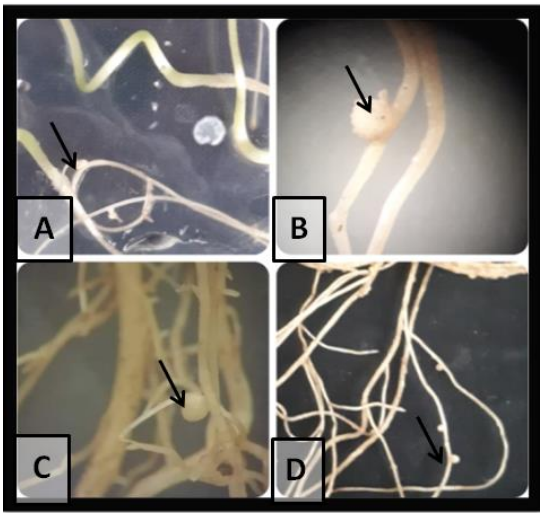
Family specialty test for isolates of *Rhizobia* bacteria

تم تحضير اللقاح البكتيري من بكتيريا الرايزوبيا بعد عزلها من العقد الجذرية للنباتات البقولية باستخدام وسط خلاصة الخميرة والمانيتول السائل Yeast Extract Mannitol Broth(YEMB) في قناني زجاجية بحجم 20 مل ثم حضن الوسط في الحاضنة الهزازة لمدة 24-48 ساعة بدرجة حرارة 1±28°م وبسرعة 150 دورة / دقيقة.

استخدم اللقاح البكتيري بتركيز (3×10^8) خلية / مل في تلقيح المجموع الجذري للبادرات البقولية المعقمة بعد نموها بثلاثة الى خمسة ايام. بعد ذلك تمت مراقبة وفحص البادرات بشكل دوري لمتابعة مراحل تكوين العقد الجذرية وباستخدام المجهر الضوئي المركب، حيث لوحظ تشوه الشعيرات الجذرية للنباتات البقولية بشكل ملتوي او بشكل يشبه عصا الراعي وكذلك الشكل الحلزوني والمتفرع والمجعد والملتف وهذا يدل على بداية حدوث الاصابة بعد خمسة ايام من تلقيح النباتات قيد الدراسة بعد ذلك لوحظ تكون العقد الاولية وبعد مرور 15-25 يوم من الاصابة تكونت العقد الناضجة وهذا ما أشار إليه الباحثان Geurts وBasseling [21].

من خلال دراسة اشكال العقد الناضجة المتكونة على جذور النباتات الملقحة وجد انها تتباين بين مجاميع بكتيريا الرايزوبيا قيد الدراسة إذ كانت اشكالها متطاولة في كل من الجت والحلبة وموزعة على التفرعات الثانوية ومحور النبات الرئيسي والملقحة بواسطة مجاميع البكتريا RhS وRhG التي سبق ان تم الحصول عليها من عقد نباتات الجت والحلبة على التوالي. و اشكال كروية منتظمة ناتجة على جذور نباتات العدس والحمص والباقلاء والفاصولياء والبرسيم وتفرعاتها الثانوية والتي لقحت سابقا بواسطة بكتيريا الرايزوبيا للمجاميع RhC وRhA وRhV وRhPh وRhM على التوالي. في حين كانت العقد المتكونة على جذور نباتات البازلاء واللوبيا اهليجية الشكل والملقحة مسبقاً ببكتيريا الرايزوبيا لمجموعتي RhP وRhR المعزولة من العقد الجذرية لنباتات البازلاء واللوبيا على التوالي والشكل(1) يوضح اشكال العقد الجذرية على جذور بعض النباتات البقولية قيد الدراسة. وقد وصف الباحثين Selami واخرون [22] بان اشكال العقد تكون طولانية عند دراستهم شكل العقد وتشريحها في نبات *Retma monosperma* في الجزائر. وذكر الباحثين Wong واخرون [23] عند دراستهم اشكال وتركيب العقد الجذرية المتكونة بواسطة سلالات بكتيريا *Rhizobium meliloti* و*Agrobacterium* ان اشكال العقد تكون طولية في جذور نبات الجت *Medicago sativa* بعد (6-7) ايام من التلقيح ثم تصبح اسطوانية بعد ثلاثة اسابيع او اكثر.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/



شكل رقم (1) يوضح اشكال العقد الجذرية المتكونة على جذور عدد من النباتات البقولية الملقحة مختبرياً.

A: العقد الجذرية المتكونة على جذور نبات الجت (الجزء الموشر).

B: العقد الجذرية المتكونة على جذور نبات البازلاء (الجزء الموشر).

C: العقد الجذرية المتكونة على جذور نبات الباقلاء (الجزء الموشر).

D: العقد الجذرية المتكونة على جذور نبات الحمص(الجزء الموشر)

الصفات المظهرية والزرعية لعزلات بكتيريا الرايزوبيا

Morphological and Cultural Characters for Isolated Rhizobial Bacteria

ظهرت مستعمرات بكتيريا الرايزوبيا النامية على وسط YEMA بالوان متفاوتة ما بين الكريمية والعاجية ذات حافات ملساء ولزجة القوام ودائرية. ولوحظ ان المستعمرات تنتج سكريات متعددة خارج خلوية وبكميات مذهلة على هذه الاوساط الغنية بالكاربون وخلال ايام قليلة بعد ظهورها على وسط YEMA فان المستعمرات تقطر مادة لزجة بوفرة على غطاء الطبق حتى اذا خزنت عند درجة حرارة 4°م. وعند اخذ مسحات من المستعمرات النامية وصبغها بصبغة كرام ثم فحصها باستخدام العدسة الزيتية الخاصة بالمجهر الضوئي المركب لوحظت أنها بكتيريا عصوية الشكل وسالبة لصبغة كرام وهذا ما لاحظه ايضا الباحثان Rajkumarو Iyer [1].

بينما كانت صفة اللزوجة في مجاميع بكتيريا الجت والحلبة RhS وRhG قليلة ومشابهة للبكتيريا التي قام بعزلها الباحثين Hussain واخرون [24] عند دراستهم خصائص بكتيريا الرايزوبيا لستة سلالات معزولة من نبات الجت alfalfa في منطقة فيصل اباد في باكستان. في حين كانت المجاميع RhC و RhA و RhV و RhPh و RhM و RhP وRhR كثيرة اللزوجة، حيث تتشابه هذه النتائج مع النتائج التي توصل لها Sajjad واخرون [25] بعد عزلهم ودراستهم لعشرة اصناف مختلفة من بكتيريا الرايزوبيوم العائدة لنبات العدس البقولي الذي ينمو في اماكن مختلفة من اقليم البنجاب في باكستان حيث كانت المستعمرات صمغية كثيرة اللزوجة وشفافة دائرية مع حافات ملساء او ناعمة وكانت جميع السلالات سالبة وعصوية الشكل عند صبغها بصبغة كرام.

الاختبارات البايوكيميائية Biochemical Tests

اجريت عدد من الاختبارات البايوكيميائية لعزلات بكتيريا الرايزوبيا والموضح نتائجها في الجدول (5)، ووجد ان مجموعة RhS التي تصيب نبات الجت لها القابلية على الحركة عند تنميتها على وسط (SIM) شبه الصلب بطريقة الطعن حيث لوحظ ان النمو البكتيري قد انتشر في الوسط. ولوحظ تكون فقاعات غازية على الشريحة الزجاجية المستخدمة في الفحص بعد اضافة

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

مســـتعمرات فتية من هذه المجموعة على محلول بيروكســـيد الهيدروجين H_2O_2 تركيزه 3% مما يدل على قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يختزل H_2O_2 ويحرر الاوكســـجين هذه النتائج تتوافق مع ما ذكره الباحثين Wadhwa واخرون [16] عند دراســـتهم لعزلات البكتيريا من جنس *Mesorhizobium* المعزولة من عقد نبات الحمص في حين ان تلون ورقة الترشـــيح المبللة بقطرات من كاشف الاوكسيديز باللون البنفسجي يدل على قابلية البكتيريا على انتاج انزيم Cytochrom oxidase.

في حين أن اختبارات الفوكس بروسكر واستهلاك السترات وانتاج انزيم الجيلاتينيز وكذلك انتاج H_2S كانت نتيجتها سالبة وهذه النتيجة تتوافق مع ماتوصل اليه الباحثينDeka وAzad [26]عند دراستهم لـ157 عزلة من بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من ستة مضايف بقولية شائعة ومن ستة اماكن مختلفة في منطقة اسام في الهند. اما اختبارات الاندول وانتاج انزيم اليوريز فقد كانت موجبة وكذلك انتاج الحامض من سكر الكلوكوز والرامنوز والمالتوز والمانوز واللاكتوز فقد كانت موجبة حيث تعمل مجاميع البكتيريا على تحليل السكريات وانتاج الحامض الذي يسبب تغير لون الوسط من اللون الاصفر الى اللون الاحمر وقد كانت هذه النتائج مشابهة لما توصل اليه الباحثين Shahzad واخرون [27] بعد دراستهم 50 عزلة من بكتيريا *S.meliloti* المعزولة من عقد نبات الجت ومن خلال مقدرتها على تحليل السكريات وتغير لون الوسط إلى اللون الاحمر.

كما يبين الجدول (5) ان مجموعة RhG التي لها القابلية على اصـــابة نبات الحلبة تكون موجبة لاختبار الحركة وكذلك انتاجها لانزيمي الـ Catalase و Cytochrom oxidase وكانت نتائج اختبارات انتاج الحامض من السكريات موجبة بدلالة تغير لون الوســط من الاصــفر الى اللون الاحمر لكل من ســكر الكلوكوز والرامنوز والمالتوز والمانوز واللاكتوز اما نتائج اختبار فوكس بروسكر واستهلاك السترات وانزيم الجيلاتينيز وانتاج H_2S فقد كانت سالبة. في حين ان نتيجة اختبار الاندول وانتاج انزيم اليوريز موجبة وهذه النتائج تتوافق مع ماذكره الباحثيين Singh واخرون [13] عند دراســـتهم لبكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من عقد نبات الحلبة.

ويوضـــح الجدول(5) ان مجموعة بكتيريا الرايزوبيوم RhC المعزولة من العقد الجذرية لنبات العدس لها القابلية على الحركة وكذلك كانت منتجة لانزيمي الكاتاليز والاوكســـيديز وتكون هذه المجموعة موجبة لاختبار الاندول وانتاج انزيم اليوريز وكذلك انتاج الحامض من الســكريات مثل الكلوكوز والرامنوز والمالتوز والمانوز واللاكتوز كانت نتيجتها موجبة. بينما اختبارت الفوكس بروســكر واستهلاك سترات الصوديوم وانتاج غاز H_2S كانت سالبة , بالاضافة الى انها غير قادرة على انتاج انزيم الجيلاتينيز.

كما يوضـح الجدول (5) ان مجموعة بكتيريا الرايزوبيوم RhA التي تم الحصـول عليها من العقد الجذرية لنبات الحمص انها موجبة لاختبار الحركة وكذلك منتجة لانزيمي الكاتاليز والاوكســيديز , ولوحظ ايضــا ان نتيجة اختبار اليوريز والاندول كانت موجبة ووجد ان هذه النتائج تتوافق مع ماذكره الباحثين Wadhwa واخرون [16] عند دراستهم لعزلات بكتيريا الرايزوبيوم التي تم الحصـول عليها من العقد الجذرية لنبات الحمص، حيث ذكروا ان المســـتعمرات تكون دائرية وذات الوان متباينة مابين الكريمي والابيض وانها متحركة ومنتجة لانزيمي الكاتاليز والاوكســـيديز. بينما كانت نتائج اختبار انتاج الحامض من الســـكريات مثل الكلوكوز والرامنوز والمالتوز والمانوز واللاكتوز ايضـا موجبة, ووجد ان اختبار الفوكس بروسكر واسـتهلاك سترات الصـوديوم وانتاج غاز H_2S وانزيم الجيلاتينيز سالبة وهذه النتيجة تتوافق مع ماوجده الباحثين Roychowdhury واخرون [28] عند دراستهم لعزلات بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من عقد نبات الحمص.

كذلك عند ملاحظتنا للجدول (5) فان مجموعة RhV التي تصـــيب نباتات الباقلاء لها القابلية على الحركة ومنتجة لانزيمي الاوكســـيديز والكاتاليز وموجبة لاختبار الاندول وانزيم اليوريز ولوحظت هذه النتائج في الدراســـة التي اجراها الباحثين Elzanaty واخرون [29] على بكتيريا الرايزوبيوم التي عزلت من العقد الجذرية لنباتات الباقلاء في مناطق مختلفة من مصـــر حيث وجدوا ان العزلات لها القابلية على الحركة ومنتجة لانزيمات الكاتاليز والاوكســـيديز واليوريز وموجبة لاختبار الاندول ايضـــا , اما اختبار

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

الفوكس بروسكر واستهلاك سترات الصوديوم وانتاج غاز H_2S وانزيم الجيلاتينيز فقد كانت سالبة في حين ان نتائج الاختبار الخاصة بانتاج الحامض من السكريات التالية الكلوكوز والرامنوز والمالتوز والمانوز واللاكتوز كانت موجبة.

أما بقية مجاميع بكتيريا الرايزوبيوم مثل RhPh, RhM , RhP وRhR والتي عزلت من العقد الجذرية لنباتات البرسيم والفاصولياء والبازلاء واللوبيا على التوالي. كانت موجبة لاختبار الحركة وكانت جميع العزلات قادرة على انتاج انزيم الكاتاليز والاوكسيديز وكذلك منتجة للاندول ولها القابلية على انتاج انزيم اليوريز وهذه النتيجة توافق ماتوصل اليه الباحثين Al-Mujahidy واخرون [30] والباحثين Hamza وAlebejo [31] عند دراستهم البكتيريا المعزولة من المحيط الجذري وكذلك من عقد نباتات اللوبيا واللبلاب. بينما كانت كل من اختبارات الفوكس بروسكور واستهلاك السترات وانتاج انزيم الجيلاتينيز وغاز H_2S ذات نتيجة سالبة وهو ماذكره الباحثين Pervin وآخرون [2] عند دراستهم لعدد من العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها من العقد الجذرية وكذلك المحيط الجذري لنباتي اللبلاب واللوبيا في بنغلاديش. وتتوافق هذه النتائج ايضا مع الدراسة التي اجراها الباحثين Kumari واخرون [32] على ستة عزلات من البكتيريا التي تصيب نبات الفاصولياء في مناطق مختلفة من الهند.

يتضح أيضاً من الجدول (5) انه عند القيام بتنمية مجاميع بكتيريا الرايزوبيا RhPh, RhV, RhA, RhC , RhG, RhS و RhP, RhM, RhR والتي عزلت من عقد نباتات الجت والحلبة والعدس والحمص والباقلاء والفاصولياء والبرسيم والبازلاء واللوبيا على التوالي، على وسط Kings Medium فان جميع العزلات كانت لها القابلية على التألق الضوئي Fluoresce (الفلورة) عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية بواسطة جهاز UV light Transilluminator عند طول موجي 320nm. وهذه النتيجة توافق ماذكره الباحثين Deora وSinghal [14] عند دراستهم لمجموعة من سلالات الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية لنبات *Vigna radiata*. كما كانت جميع عزلات بكتيريا الرايزوبيا قيد الدراسة عند زرعها على وسط Mac-Conkey Agar وهي مجاميع RhS, RhG, RhC , RhA, RhV, RhPh, RhM, RhP و RhR كانت موجبة لهذا الاختبار وهذه النتيجة توافق ماتوصل اليه الباحثين Kumari واخرون [32].

جدول رقم (5) الاختبارات البايوكيميائية لعزلات بكتريا الرايزوبيوم المدروسة

مجاميع الريزوبيا / الاختبارات	RhS				RhG				RhC				RhA				RhV				RhPh				RhM				RhP				RhR			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تحليل اليوريا	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
استهلاك السترات	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Voges Proskaur	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Mac-Conkey agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
انتاج H2S	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
انتاج الاندول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
انتاج الحامض من الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
انتاج الحامض من الرامنوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	انتاج الحامض من المالتوز
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	انتاج الحامض من المانوز
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	انتاج الحامض من اللاكتوز
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Fluorecce

(+)النتيجة الايجابية للاختبار (−) النتيجة السلبية للاختبار

اختبار مقاومة وحساسية البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للمضادات الحيوية
Resistance and Sensitivity Test of Bacteria Isolated from Root Nodules to Antibiotics

تمت دراسة تاثير عشرة من المضادات الحيوية على مقاومة وحساسية بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية كما هو واضح في الجدول رقم (6).

يبين الجدول (6) ان مجاميع بكتيريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية تختلف في درجة مقاومتها وحساسيتها للمضادات الحيوية اذ وجد ان جميع عزلات بكتيريا الرايزوبيا كانت مقاومة بنسبة 100% للمضادين الـ Nystatin وـ Amoxicillin في حين ان مقاومتها للمضادين الــ Tetracycline و Streptomycin هي الاقل وبنسبة 22.2%من مجموعة العزلات المدروسة بينما المضادات الحيوية الاخرى فقد تباينت مقاومتها كنسبة مئوية من قبل مجاميع بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة وبلغت 33.3%، و88.8% و44.4% و88.8% و77.7% و88.8% لكل من Erythromycin و Nalidixid acid و Chloramphenicol و. Rifampicin و Ampicillin و Cefixime على التعاقب.

بالاضافة الى ذلك فان مجاميع بكتيريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية في المناطق المختلفة المشمولة بالدراسة تتباين في نسبة مقاومتها لجميع المضادات الحيوية حيث ان مجموعتي RhS وRhG والتي تصيب نباتي الجت والحلبة على التوالي اظهرت مقاومة لجميع المضادات الحيوية تصل نسبتها الى60% والتي تم الحصول عليها من جميع المناطق.

اما مجاميع بكتيريا RhC والتي عزلت من العقد الجذرية لنبات العدس فقد بلغت نسبة مقاومتها 40% لجميع المضادات الحيوية المستخدمة في الاختبار ولجميع المناطق التي عزلت منها البكتيريا. بينما مجاميع بكتيريا RhA و RhV والتي تم الحصول عليها من العقد الجذرية لنباتي الحمص والباقلاء على التوالي فقد اظهرت نسبة مقاومة تصل 60% لجميع المضادات الحيوية ولجميع المناطق التي تم عزلها منها. في حين ان مجاميع RhPh و RhP المعزولة من عقد نباتي الفاصولياء والبازلاء على التوالي كانت نسبة مقاومة البكتيريا لهذه المجاميع 50% ولجميع المضادات الحيوية قيد الاختبار والتي تم الحصول عليها من المناطق المختلفة المشمولة بالدراسة. وكانت نسبة مقاومة مجاميع RhM والتي تصيب نبات البرسيم عالية حيث تصل الى 80% والتي اخذت من المناطق الاربعة التي شملتها الدراسة. وبلغت نسبة مقاومة مجاميع بكتيريا RhR لجميع المضادات الحيوية 90% وقد عزلت هذه المجموعة من العقد الجذرية لنبات اللوبيا ومن جميع المناطق التي زرعت لغرض عزل البكتيريا.

جدول رقم (6) مقاومة وحساسية بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من عقد البقوليات للمضادات الحيوية

مجاميع بكتيريا الرايزوبيوم المستخدمة في الدراسة حيث تضم كل مجموعة اربعة عزلات																																				التركيز النهائي µg/ml	المضادات الحيوية	ت
RhR				RhP				RhM				RhPh				RhV				RhA				RhC				RhG				RhS						
4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1			
R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	10	Tetracycline	1
S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	20	Streptomycin	2

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	15	Erythromycin	3
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	30	Nalidixic acid	4
R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	30	Chloramphinicol	5
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	50	Nystatin	6
R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	50	Rifampicin	7
R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	50	Ampicilin	8
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	50	Amoxilin	9
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	50	Cefixime	10

(S) ظهور صفة الحساسية (R) ظهور صفة المقاومة

ذكر في احدى الدراسات لـــGauri واخرون [33] التي اختصت بدراسة نمط المقاومة للمضادات الحيوية في 85عزلة من بكتيريا الرايزوبيوم *Trifolium alexandrinum* التي تنمو بشكل واسع في الهند وذلك عند استخدام الباحثين عدد من المضادات الحيوية وكانت اغلب العزلات تمتلك مقاومة بنسبة كبيرة للمضاد الحيوي الـــStreptomycin تصل الى96% وكذلك لديها مقاومة عالية للمضـــادين الحيويين الـــــ Chloramphenicol و Ampicillin بلغت نســـبتها 94% وكانت نســـبة المقاومة لل Erythromycin 93% في حين ان نسبة المقاومة للـــــ Kanamycin و Polymyxin 92% بينما Nalidixid acid نسبة المقاومة له 88% والـ Gentamycin 86% و Neomycin 85% اما المضاد الحيوي الـ Vancomycin 58% في حين كانت نســـبة مقاومة العزلات للمضـــادين Rifampicin و Cephalothicin 44% وأقلها مقاومة 33% للمضـــاد الحيوي الـــــــ Tetracyclin.

تتفق هذه النتائج مع دراســة اجريت على 48 ســلالة من بكتيريا *Rhizobium japonicum* لاختبار مقاومتها للمضـــادات الحيوية وجد ان اكثر من 60% من السلالات كانت مقاومة للمضاد الحيوي الـــكلورامفينيكول والبوليمكسين والاريثرومايسين وكانت 47% او اكثر من السلالات مقاومة للنيومايسين والبنسلين G– عند اختبارها بواسطة اقراص المضادات الحيوية [34].

وفي دراسة اجراها الباحثين Shama و Diwan سنة (2011) شملت عزل بكتيريا الرايزوبيا من عشرة نباتات بقولية مزروعة وهـــي *Phaseolus aureus, Phaseolus vulgaris, Arachis hypogaea, Dolichos) lablab, Glycine max, Lathyrus sativa* و *Trigonella foenum graecum, Cicer arietinum, Vigna ungiculeta, Pisum sativum* (وثلاث انواع بقولية برية هي *triflorum* (*Mimosa pudica, Desmodium* و *Tephrosia purpurea*) تنمو في الهند حيث تضـمنت الدراسـة اختبار الحسـاسـية والمقاومة لثلاث عشـرة عزلة بكتيرية تابعة للجنس *Rhizobium* spp. ولخمسـة من المضـادات الحيويـة وهي Streptomycin و Penicillin-G و Erythromycin و Teramycin و Norfloxacin وبثلاثـة تراكيز مختلفـة (0.5%,1%,1.5%) ، وأظهرت عزلات بكتيريا الرايزوبيوم مقاومة للمضادات الحيوية وبنسب مختلفة حيث كانت العزلة R10 مقاومة بنسبة 100% للمضـاد الحيوي Streptomycin وكانت العزلات R13,R9 مقاومة بنسبة 100% للمضـاد الحيوي Penicillin-G والعزلة R8 تمتلك مقاومة بنســبة 100% للمضـــادTeramycin بينما العزلة R4 فقد كانت لها القدرة على مقاومة المضـــاد الحيوي Erythromycin بنسبة 100% [35].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

وعند مقارنة نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية مع نتائج هذه البحوث يمكن الاستنتاج بان هناك صفات مشتركة الى حد ما بين مجاميع البكتيريا المستخدمة في الدراسة مع البكتيريا التي درسها الباحثين وهي صفة المقاومة العالية لعدد من المضادات الحيوية مثل الامبسيلين (Ap) وحامض الناليدكسك (Nal) والكلورامفينيكول (Cm) والنيستاتين (Nys) والاموكسيلين (Amo) والريفامبيسين (Rif) والاريثرومايسين (Ery) في حين كان مستوى المقاومة واطى بالنسبة للمضادين الستربتومايسين (Str) و التتراسايكلين (Tc).

اختبار مقاومة وحساسية البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للمعادن الثقيلة

Resistance and Sensitivity Test of Bcteria Isolated from Root Nodules to Heavy Metal

من خلال ملاحظة الجدول (7) وجد ان مجاميع بكتيريا الرايزبيوم والتي عزلت من العقد الجذرية للنباتات البقولية كانت جميعها مقاومة لكل من كلوريد الكادميوم $CdCl_2$ وكلوريد الكوبلت $CoCl_2$ بنسبة 100% بينما كانت مقاومة هذه المجاميع للمعدن الثقيل كلوريد النيكل $NiCl_2$ بنسبة 77.7% في حين ان نسبة المقاومة لاملاح المعدن الثقيل كلوريد الزئبق $HgCl_2$ كانت 33.3% ولجميع العزلات المدروسة.

كذلك أظهرت عزلات البكتيريا لمجموعة (RhC) اعلى نسبة مقاومة وهي 100% لجميع املاح المعادن الثقيلة بينما المجاميع البكتيرية الاخرى مثل RhP,RhM,RhPh,RhV,RhA,RhG,RhS و RhR والمعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت والحلبة والحمص والباقلاء والفاصولياء والبرسيم والبازلاء واللوبيا على التوالي، ولجميع المناطق المشمولة بالدراسة فقد كانت نسبة مقاومة البكتريا لاملاح المعادن الثقيلة عالية وعليه يمكن القول ان جميع عزلات بكتيريا الرايزوبيوم المستخدمة في الدراسة لديها مقاومة متعددة لاملاح المعادن الثقيلة وتعتبر صفة المقاومة صفة شائعة في بكتيريا الرايزوبيوم.

جدول رقم (7) مقاومة وحساسية بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من عقد النباتات البقولية للمعادن الثقيلة

ت	المعادن الثقيلة	التركيز النهائي µg/ml	مجاميع بكتيريا الرايزوبيوم المستخدمة في الدراسة حيث تضم كل مجموعة اربعة عزلات																													
			RhS				RhG				RhC				RhA				RhV				RhPh				RhM				RhP				RhR			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	$NiCl_2$	25	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
2	$HgCl_2$	25	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	$CdCl_2$	25	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	$CoCl_2$	25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(+) مقاومة (++) متوسطة المقاومة (+++) عالية المقاومة

علما بان بكتيريا الرايزوبيوم قد تحمي نفسها من التاثير السام لاملاح المعادن الثقيلة من خلال عدد من الاليات منها : 1- التخلص من ايونات المعادن الثقيلة عن طريق ضخها او قذفها خارج الخلية بعملية يسيطر عليها الكروموسوم والبلازميد .2- اختزال ايونات المعادن الثقيلة وتحويلها الى صورة اقل سمية .3- تكوين معقدات لايونات المعادن الثقيلة داخل الخلية [36].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

بين الباحثان Paul واخرون [37] ان السمية والتراكم الحيوي للمعادن الثقيلة في البيئة تؤثر بشكل كبير على حياة الكائنات الحية، على عكس الملوثات العضوية ولايمكن تفكيك المعادن الثقيلة عن طريق العمليات الكيميائية والبيولوجية، ولكن يمكن تحويلها الى انواع اقل سمية، حيث قام هؤلاء الباحثين بعزل البكتيريا التي تتحمل وجود المعادن الثقيلة من مختلف المناطق الصناعية الملوثة في مدينة حيدر اباد في الهند وتم اختبارها لمعرفة خصائصها التي تعزز نمو النبات وتم عزل احدعشر سلالة ستة انواع منها تعود للبكتيريا العصوية والخمسة الاخرى تعود لبكتيريا الرايزوبيوم وتم اختبار تحملها للمعادن الثقيلة التالية(Ni,Cd,Co,Pb) من خلال اضافتها بالتراكيز التالية(0,25,50,100,150,200 ملغم /لتر) الى وسط الاكار المغذي Nutrient agar ووسط خلاصة الخميرة والمانيتول الصلب YEMA. ومن بين جميع العزلات كانت السلالات العائدة لبكتريا الرايزوبيا AfSB−1 و SfSB−5 و AfSR−1 و SfSR−4 القدرة على تحمل تراكيز تصل الى 100 ملغم /لتر ولجميع المعادن كما وجد ان اربعة سلالات فقط وهي (AfS−1 ,AfS−15, SfS−5 وSfS−18) مقاومة للتراكيز الاعلى من 100ملغم /لتر ومن بين ستة عزلات للبكتيريا العصوية وجد ان السلالة (SfS−5) مقاومة لتراكيز اعلى من 100 ملغم /لتر لكل من Ni وCo واكثر من 150ملغم/لتر لمعدن الكادميوم Cd و200 ملغم /لتر لمعدن الرصاص Pb في حين ان السلالة SfS−4 من عزلات بكتيريا الرايزوبيوم كانت مقاومة للتراكيز الاعلى من 100 ملغم / لتر من املاح النيكل والكادميوم والكوبلت واكثر من 150 ملغم / لتر لاملاح الرصاص.

وان جميع سلالات البكتيريا العصوية وبكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من التربة الملوثة بالمعادن الثقيلة (Ni,Cd,Co,Pb) اظهرت مقاومة لهذه المعادن عند التركيز 25 ملغم / لتر.

وفي دراسة اجرها الباحثينRuiz−Diez واخرون [38] المتعلقة بعزل البكتيريا التكافلية من البقوليات النامية في تربة ملوثة بالزئبق في مدينة Almaden في اسبانيا لانتاج مجموعة من بكتيريا الرايزوبيا يمكنها التكيف بشكل جيد مع الظروف البيئية لهذه المنطقة واستخدامها في عمليات الترميم واصلاح التربة، حيث تم الحصول على تسعة عشر عزلة من بكتيريا الرايزوبيا لها القدرة على تحمل الزئبق Hg من العقد الجذرية لاحد عشر نبات بقولي من الاجناس (*Medicago , Trifolium , Vicia , Lupinus Phaseolus, و Retama*). وتم تمييزها بناء على نموها في الاوساط المكملة بالزئبق حيث صنفت هذه العزلات الى ثلاثة مجاميع اعتمادا على قدرتها على تحمل Hg وقد حدد التركيز المثبط الادنى والتراكيز الفعالة التي تنتج انماط تحمل الزئبق بنسبة 50% حيث اظهرت ان 15 عزلة لها القدرة على تحمل الزئبق، وقد بينت ديناميكية نمو الخلايا اثناء فترة التحضين مع معدن الزئبق ان خمسة عزلات لم تتأثر بالتعرض لتراكيز الزئبق تحت الحد الادنى من التثبيط , كما حدد التحليل الوراثي للجين 16SrRNA والعائدة لعشرة سلالات من بكتيريا *R.leguminosarum* ستة منها تعود لـــ *Ensifer medicae* واثنان لجنس *B.canariense* وسلالة واحدة للجنس *R.radiobacter* وان تلقيح النباتات المضيفة وتحليل جينات *nod* C كشفت ان معظمها تتأثر عضويا.

مقاومة الاحياء المجهرية في التربة تتطور نتيجة التأثير السام للمعادن الثقيلة ومن الممكن ان يحدث هذا التطور في البكتيريا السالبة لصبغة كرام احيانا بسبب وجود البلازميدات ,كما تعمل البلازميدات على زيادة التكيفات للبكتيريا وكذلك اكتساب صفات وراثية جديدة بسبب التلوث [39].

عزل وتوصيف الـ DNA البلازميدي من مجاميع بكتيريا الرايزوبيا قيد الدراسة باستخدام الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

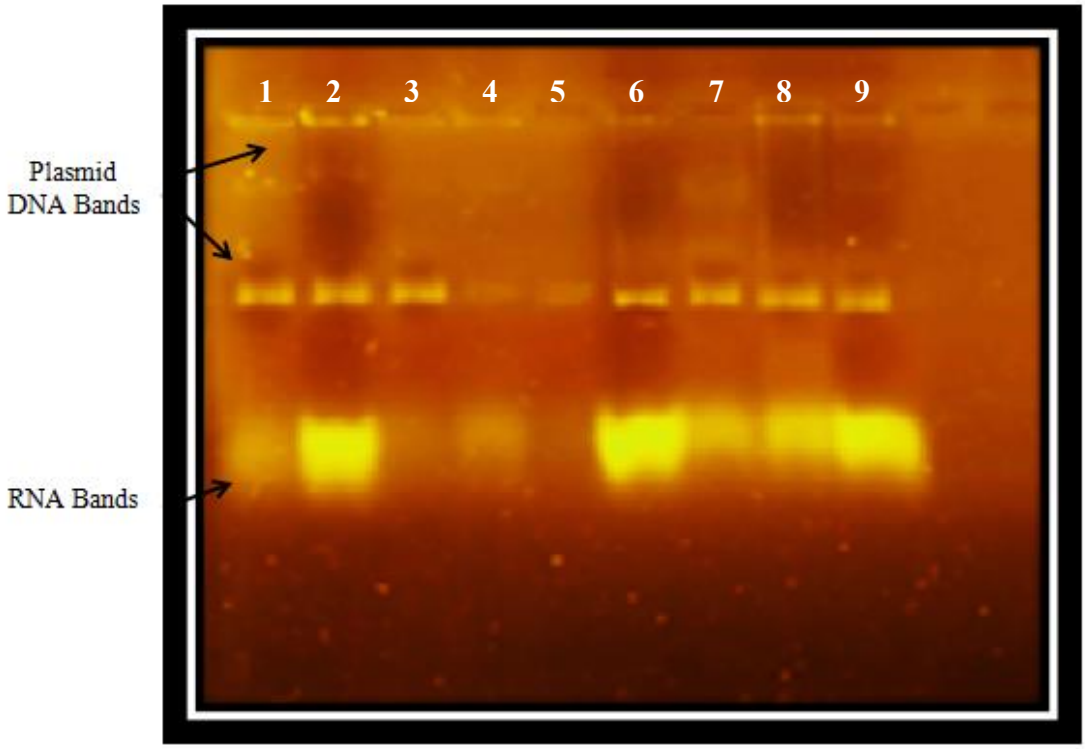
Isolation and characterization of plasmid DNA from groups of rhizobia bacteria under study using electrophoresis in agarose gel

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

تظهر حزم الـ DNA البلازميدي في الاعمدة (5,4,3,2,1) المحتوى البلازميدي للمجاميع البكتيرية RhS وRhM وRhG وRhC وRhV على التوالي. بينما الاعمدة (9,8,7,6) تمثل المحتوى البلازميدي للمجاميع البكتيرية RhP وRhA وRhR وRhPh، على التوالي.

كما يوضح الشكل (2) احجام حزم الـ DNA البلازميدي التي ظهرت بصورة واضحة ومميزة لقربها من حفر هلام الاكاروز (1%) مما يدل على احجامها الكبيرة لانها تحركت لمسافات قصيرة في الاعمدة المحضرة كنماذج للـ DNA البلازميدي، اي ان الحزم التي قطعت مسافات متساوية في جميع هذه النماذج وهذا يدل على انها ذات احجام متساوية وقد تدل على انها من نوع الـ Mega plasmid DNA المتواجد في هذه الانواع من البكتيريا، كما لوحظ وجود حزم من الـ DNA البلازميدي صغيرة الحجم قطعت مسافة طويلة في الهلام وهي عبارة عن بلازميدات من نوع اخر موجودة ايضا في هذه الانواع من البكتيريا.

يوضح الشكل (2) نتائج الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز.



شكل (2) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي في هلام الاكاروز (1%) لمجاميع بكتيريا الرايزوبيا قيد الدراسة.

بناء على ذلك يمكن القول ان هناك نوعين من البلازميدات ضمن محتوى الـ DNA البلازميدي لعزلات بكتيريا الرايزوبيوم المدروسة الاول كبير في الحجم يدعى Mega plasmid يمثل البلازميدات التكافلية التي تحمل جينات تكوين العقد وتثبيت النيتروجين والنوع الاخر صغير في الحجم يمثل البلازميدات الغير تكافلية. ونتيجة عدم استخدام انزيم RNase لمعاملة عينات الـDNA المنقى من مجاميع بكتيريا الرايزوبيا ادت الى ظهور حزم من الـ RNA في نهاية اعمدة الهلام. عليه اشار MacLean واخرون [40] أن غلب انواع بكتيريا الرايزوبيوم تملك جينوم يضم بلازميدات كبيرة في حجمها تسمى Mega plasmid يصل حجمها احيانا الى 1500kbp حيث تقع على هذه البلازميدات الجينات التي تشفر عملية تكوين العقد الجذرية وتثبيت النيتروجين.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

مثل بكتيريا *R.etli* السريعة النمو تمتلك ستة بلازميدات صغيرة وهي تمثل ثلث حجم الجينوم الكلي الذي يصل حجمه الى6.5Mb بينما بكتيريا *Bradyrhizobium* البطيئة النمو فإنها تفتقر لهذا النوع من البلازميدات.

الاستنتاجات

تشير اختبارات التخصص العائلي للبكتيريا امكانية استخدامها كأدلة في عملية التشخيص أما اختلاف مجاميع بكتيريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنباتات البرسيم والجت والحلبة والعدس والحمص والباقلاء والفاصولياء والبازلاء واللوبيا في مستوى المقاومة لعشرة من المضادات الحيوية واربعة من المعادن الثقيلة وحتى بين سلالات النوع الواحد فقد يعود السبب غالباً لاختلاف البيئة التي عزلت منها. من ناحية اخرى تم تأكيد وجود نوعين من البلازميدات مختلفة في الحجم استنادا الى نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (1%) لمحتوى الـ DNA البلازميدي. ومن خلال ملاحظة نمو المستعمرات لمجاميع بكتيريا الرايزوبيا المعزولة على وسط YEMA تبين انها تنتج كميات من السكر المتعدد الخارج خلوي وبنسب مختلفة حتى عند حفظها بدرجة حرارة 4°م.

المصادر

1- Iyer, B. and Rajkumar, S. **Rhizobia.** In Reference Module in Life Sciences, Elsevier, Nirma University, P: 1-20(2018).

2- Pervin, S.; Jannat, B.; Alsanjee, S. And Farzana, T. **Turkish J. of Agriculture –Food Sci. Technol**., 5(1): 14-17 (2017) .

3- Setu, L.J.; Ahmed, B. and Kibria, K.Q. **Int. J.Res.Anal.Rev**., 6(2): 519-527 (2019).

4- Khalil, N.I. and Abdul Ghafoor, A. **Tikrit J. Pure Sci.,** 16(2): 188-193(In Arabic)(2011).

5- Graham, P.H. **Can. J. Microbiol.,** 38(6): 475-484 (1992) .

6- Dhull, S .; Singh.K. and Gera, R.**J.Chem.Sci.Rev.Lett**., 7(26): 692-697 (2018).

7- Talaro, K. and Talaro, A. **Foundations in microbiology.**3th ed, McGraw-Hill companies, Inc., U. S. A.(1999).

8- Graham, P.H. **Appl. Microbiol**., 17(5): 769-770 (1969).

9- Vincent, J.M. **A Manual for the Practial Study of Root Nodule Bacteria.**IBP Handbook No.15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 113-131(1970).

10- Fahraeus, G. **J. Gen. Microbiol.,** 16(2): 374-381 (1957).

11- Grant, A.J. and Pittard, J. **J.Bacteriol**., 120(1): 185-190(1974).

12- Ahmed, K.D. **The Positive Control of ilvc expression in *E.coli* K-12**. Ph. D. Thesis, Univ. Durham, England(1989).

13- Singh, B.; Kaur, R. and Singh, K. **Afr. J. Biotech.,** 7(20): 3671-3676 (2008).

14- Deora, G.S. and Singhal, K. **Int. Sci. J.,** 3(2): 132-136 (2010).

15- Chhetri, T.K.; Subedee, B.R. and Pant, B.**Nep. J. Biotechnol**., 7(1): 39-49 (2019).

16- Wadhwa, Z.; Srivastava, V.; Rani, R.; Tanvi; Makkar, K. and Jangra, S. **Int. Curr. Microbiol. Appl. Sci.,** 6(11): 2880-2893 (2017).

17- Cappuccino, J.G. and Sherman, N. **Microbiology a laboratory Manual.** 5th ed, Addison Wesley Longman, Inc., p.133-145(1999).

18-Benson, H.J. **Microbiological,** 8th ed, McGraw Hill Companies, Inc., p.130-155(2002).

19-Baron, E.J.; Pezlo, M.T. and Delamaza, L.M. (1997) **Color Atlas of Diagnostic Microbiology.** Mosby-Year Book, United Startes of America, p.25-92(1997).

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

20-Atlas, R.M.; Brown, A.E. and Parks, L.C. **Laboratory Manual of Experimental Microbiology.** Mosby-Year Book, Inc., St-Louis, U.S.A.(1995).

21- Geurts, R. and Basseling, T. **The plant cell,** 14: 239-249 (2002).

22-Selami, N.; Auriac, M.C.; Catrice, O.; Capela, D.; Harche, M.K. and Timmers, T. **J. Plant-Soil,** 379(1-2): 109-119 (2014).

23-Wong, C.H.; Pankhurst, A.; Kondorosi, and Broughton, W.J. **J. Cell Biol.,** 97: 787-794 (1983).

24- Hussain, M.; Ashraf, M.; Saleem, M. and Hafeez, F.Y. **Pak. J. Agri. Sci.,** 39: 32-34 (2002).

25- Sajjad, M.; Malik, T.A.; Arshad, M.; Zahir, Z.A.; Yusuf, F. and Rahman, S. **Int. J. Agri. Biol.,** 10(5): 505-510 (2008).

26- Deka, A.K. and Azad, P. **Legume Res.,** 29(3): 209-212 (2006).

27- Shahzad, F.; Shafee, M.; Abbas, F.; Babar, S.; Tariq, M.M. and Ahmad, Z. **J. Ani. Pla. Sci.,** 22(2): 522-524 (2012).

28- Roychowdhury, D.; Paul, M. and Banerjee, S.K. **Euro. J. Biotech. Biosci.,** 3(12): 26-29 (2015).

29- Elzanaty, A.M.; Hewedy, O.A.; Nagaty, H.H. and Abd Elbary, M.I. **J. Bioeng. Biomed. Sci.,** 5(1): 1-8 (2015).

30- Al-Mujahidy, S.M.J.; Hassan, M.M.; Rahman, M.M. and Mamun-or-Rashid, A.N.M. **Int. Res. J. Biotech.,** 4(7): 117-123 (2013).

31- Hamza, T.A. and Alebejo, A.L.**Int . J . Novel Res. in Interdisciblinary Studies**, 4(4): 1-7 (2017).

32- Kumari, N.N.B.; Nagaraju, B. and Mallkarjuna, K. **Inn. Int. J. Med. Pharm. Sci.,** 2(2): 8-13 (2017).

33- Gauri; Singh, A. K.; Bhatt, R.P.; Pant, S.; Bedi, M.K. and Naglot, A. **J. Agri. Technol.,** 7(6): 1705-1723 (2011).

34- Cole, M.A. and Elkan, G.H. **J. Appl. Environ. Microbiol.,** 37(5): 867-870 (1979).

35- Shama, S. and Diwan, R. **J. Ecobiotech.,** 3(4): 13-15 (2011).

36- Khan, M.S.; Zaidi, A.; Wani, P.A. and Oves, M. **J. Environ. Chem. Lett.,** 7: 1-19 (2009).

37- Paul, M.N.; Triveni, S.; Latha, P.C.; Patnaik, M.C. and Rao, A.M. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci .,** 7(8): 3583-3591 (2018).

38- Ruiz-Diez, B.; Quinones, M.A.; Fajardo, S.; Lopez, M.A.; Higueras, P. and Fernanez-Pascual, M. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** 96(2): 543-554 (2012).

39- Silver, S. **Plasmid,** 27(1): 1-3 (1992).

40- MacLean, A.M.; Turlough, M.F. and Michael, J.S. **Plant Physiol.,** 144(2): 615-622 (2007).

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/