



## التحري والحصول على عزله من بكتريا *Rhizobium* متحملة للملوحة بأستعمال طريقة التحول الوراثي.

شيماء خلف عثمان      ظافر فخري عبد القادر

جامعة الأنبار - كلية التربية للعلوم الصرفة

### الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة لعزل بكتريا الرايزوبيا *Rhizobium* من جذور النباتات البقولية البرية والحقلية (البرسيم، الجت، الباقلاء، البزاليا، القرط، الحندقوق، السيسبان، الحليبه)، تم الحصول على 30 عزلة من جذور النباتات بواقع 15 عزلة من جذور النباتات البقولية البرية و 15 اخرى من النباتات البقولية الحقلية، انتخبت أكفاً ثمان عزلات مثبتة للنتروجين الجوي على اساس قطر المستعمرات، وكذلك قطر تغير لون وسط دليل البروموثايمول الأزرق YEMA-BTB. درست الظروف المثلى لتنمية العزلات المنتخبة من ناحية درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وتحملها لملوحة الوسط وعلى اساس ذلك انتخبت أكفاً عزلة برية اعطيت الرمز pw7 المعزولة من نبات السيسبان البري وكذلك اكفاً عزلة حقلية اعطيت الرمز PF12 المعزولة من الجت، كما تضمن البحث دراسة المحتوى الوراثي للعزلتين المنتخبتين، اظهرت نتائج الدراسة احتواء العزلتين على حزمتين بلازميديتين صغيرتي الحجم واحتواء عزلة PF12 على حزمة بلازميدية اضافية كبيرة الحجم ولدراسة دور هذه البلازميدات في التشفير لصفة تحمل الملوحة اجريت تجربة تحييد البلازميدات بأستخدام حامض السالسليك واظهرت النتائج فقدان صفة تحمل الملوحة من الخلايا المحييدة عند اختبارها على وسط YEMA بتراكيز ملحية مختلفة، اجريت تجربة التحول الوراثي وذلك بنقل الـ DNA الكلي المستخلص من العزلة pw7 الى العزلة PF12 اظهرت نتائج هذه التجربة انتقال البلازميدات من pw7 الى PF12 مما تسبب في نقل صفة تحمل الملوحة، وتم التأكد من انتقال صفة تحمل الملوحة بأعادة زرع العزلة المحورة على الوسط الزرع YEMA بتراكيز ملحية مختلفة واستطاعت النمو في التركيز الملحي 8% NaCl.

### معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2013/00/00  
تاريخ القبول: 2014/5/6  
تاريخ النشر: / / 2022

DOI: 10.37652/juaps.2014.122637

### الكلمات المفتاحية:

البلازميدات،  
تحمل الملوحة،  
*Rhizobium*

### المقدمة:

الزرعي الذي تركيز كلوريد الصوديوم فيه 5% كما استطاع (3) عزل رايزوبيا مقاومة لتركيز كلوريد الصوديوم الى حد 8% وبين ان هناك علاقة ايجابية بين تحمل الملوحة ومقاومتها للعيش في وسط ذو رقم هيدروجيني 9 ودرجة حرارة مرتفعة 40م، ونتيجة لعيش الرايزوبيا في التركيز الملحي 5% فقد اوضح (4) استطاعت هذه العزلات من التكيف لهذا الوسط بواسطة انتاجها ل6 انواع بروتينات وبأوزان جزيئية مختلفة (95-22) الف دالتون.

اشار (5) الى ان عزلات الرايزوبيا سريعة النمو Fast-growing اقل تحملا للحامضية من تلك بطيئة النمو Slow-growing

يعد جنس *Rhizobium* من المخصبات الحيوية واسعة الانتشار في مجال التسميد الحيوي وهو من الأجناس المثبتة للنتروجين الجوي بصورة تعايشية مع النباتات البقولية كما تتواجد بمعيشة رمية في التربة عند غياب العائل البقولي (1) ونظرا للأهمية الاقتصادية لبكتريا الرايزوبيا فقد حاول الباحثون الحصول على عزلات متحملة للملوحة فقد تمكن (2) من الحصول على 4 عزلات لها القدرة على النمو في الوسط

\* Corresponding author at: University of Anbar ,Collage of Education  
E-mail address:

PW3, PW7, PW13, PW24 على وسط YEMA بطريقة التخطيط وحضنت لمدة 5 ايام.

#### \*الرقم الهيدروجيني (pH) :

لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل للنمو زرعت العزلات اعلاه على وسط YEMA ذو الأرقام الهيدروجينية (10,9,8,7,6,5) وحضنت لمدة 5 ايام بدرجة حرارة  $28 \pm 2$ م.

#### \*الملوحة:

تم اختبار قابلية العزلات على النمو في تراكيز ملحية مختلفة (1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%) بزراعتها على وسط YEMA وحضنت بنفس درجة الحرارة والمدة.

#### 3- عزل DNA البلازميدي:

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (9) أذ حضرت مزارع بكتيرية سائلة للعزلتين (PW7, PF12) لدراسة محتواها البلازميدي وبعد حضانة 24 ساعة نقل 200 مايكروليتر من المزروع البكتيري الى انابيب Appendorf ونبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 7000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة، اضيف لها 200 مايكروليتر من محلول (I) المحضر من EDTA و Tric-HCL نبذت بنفس السرعة لمدة 5 دقائق ثم اضيف محلول (II) المحضر من NaOH, S.D.S بنفس الكمية واخيرا اضيف محلول خلاص البوتاسيوم ونبذت بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة نقل الرائق الى انبوب اخر واضيف له 420 مايكروليتر من Isopropanol نبذت بنفس السرعة والمدة طرح الرائق واضيف للراسب 400 مايكروليتر ايثانول ثم نبذت لمدة 7 دقائق بنفس السرعة، اهل الرائق وتركت الأنابيب لتجف ثم اضيف لها 80 مايكروليتر من محلول الأذابة TE المحضر من Na<sub>2</sub>- EDTA.

#### 4- تحييد DNA البلازميدي:

استخدم حامض السالسيك حسب طريقة (9) كعامل محييد أذ حضرت تخافيف شملت (300, 250, 200, 150, 100, 50) مايكروليتر ونميت البكتيريا فيها لتحديد التركيز المثبط الأدنى للعامل المحييد، نميت البكتيريا فيما بعد للتراكيز الغير مثبتة على وسط YEMA واختبرت المستعمرات من حيث مقاومتها للملوحة، تم اجراء الترحيل الكهربائي للـ DNA البلازميدي في هلام الأكاروز حسب طريقة (10) قبل وبعد التحييد.

growing وحصل على عزلة واحدة من بين 45 عزلة نمت في وسط ذو رقم هيدروجيني 4 و 9 عزلات نمت في 4.5، استطاع (6) من نقل البلازميدات المتحملة للملوحة لبكتيريا *Rhizobium* سلالة K-12 عن طريق التحول الوراثي Transformation الى سلالة SP-3 لنفس النوع من البكتيريا غير متحملة للملوحة، وتم اختبار قدرة السلالة المتحولة وراثيا على تثبيت النتروجين تحت ظروف الملوحة العالية، كما اشار (7) عند دراسته لبكتيريا الرايزوبيا *Rhizobium* المتخصصة على نبات الفاصوليا ان الجينات الحاملة لصفة تحمل الملوحة محمولة على البلازميدات لذلك تهدف هذه الدراسة الى عزل بكتيريا الرايزوبيا من نباتات بقولية برية وحقلية مختلفة وترب مختلفة وتتميتها في ظروف مختبرية متباينة وانتخاب افضل عزلة برية وحقلية من اجل الحصول على عزلة بكتيرية متحملة للملوحة عن طريق التحول الوراثي.

#### المواد وطرائق العمل:

#### 1- عزل وتوصيف بكتيريا الرايزوبيا:

جمعت 84 عينة من النباتات البقولية البرية والحقلية وهي (الجب، البرسيم، الباقلاء، البزاليا، الحندقوق، السيسبان، القرط، الحليبية) من مواقع مختلفة في محافظة الأنبار لغرض عزل بكتيريا الرايزوبيا حيث ربطت التربة المحيطة بالنبات وبمجرفة معقمة قلع النبات ووضع في كيس نظيف ثم نقل الى المختبر، استعمل وسط خلاصة خميرة المانيتول الصلب (YEMA) Yeast Extract Mannitol Agar لعزل البكتيريا من العقد الجذرية حسب طريقة (8)، اعيدت زراعة المستعمرات النموذجية للبكتيريا على نفس الوسط لغرض الحصول على مستعمرات نقية كما تم حفظ العزلات على الأكار المائل للوسط نفسه في الثلجة لحين استخدامها في التجارب اللاحقة، درست المواصفات الزرعية والمجهرية وانتخبت افضل ثمانية عزلات بالأعتماد على قطر النمو على نفس الوسط وقطر التغيير لوسط -Bromothymol blue YEMA من اللون الأزرق المخضر الى الأصفر بطريقة زراعة دائرة قطرها 1سم في مركز الطبق.

#### 2- تحديد الظروف المثلى لنمو البكتيريا:

#### \*درجة الحرارة:

اختبرت درجات حرارية مختلفة هي (20, 25, 35, 40, 45)م اذ زرعت العزلات المنتخبة وهي ( PF12, PF28, PF16, PF21

## 5-التحول الوراثي:

بلغ اعلى قطر لتحول لون وسط YEMA-BTB من الأخضر المزرق الى الأصفر 45mm للرايزوبيا المعزولة من السيسان بينما كان اقل قطر 1mm للرايزوبيا المعزولة من نبات الحليبية، يعزى هذا التباين الى اختلاف قابلية العزلات على افراز مواد حامضية للوسط، وعلى اساس قابلية النمو انتخبت العزلات ( PF21, PF16, PW24, PW3, PW13, PW7, PF12, PF28).

### 2-الظروف المثلى للنمو:

#### \* درجة الحرارة:

اظهرت نتائج اختبار تأثير درجات الحرارة المختلفة في نمو الرايزوبيا قدرة جميع العزلات على النمو عند درجة حرارة 25م° و35م° بكثافة عالية، كما استطاعت النمو عند 40م° ولكن بكثافة قليلة واستطاعة عزلة واحدة من النمو في درجة حرارة 45م° من جانب اخر فقد اظهرت عزلة بكتيرية واحدة معزولة من نبات القرط عدم قدرتها على النمو عند درجة حرارة 20م° كما موضح في جدول (2).

### \*الرقم الهيدروجيني (PH):

تم الحصول على عزلات لبكتريا الرايزوبيا استطاعت النمو عند الرقم الهيدروجيني 5 كما مبين في جدول (3) كما استطاعت النمو بكثافة عالية عند الأرقام الهيدروجينية 6,7,8, عدا العزلات PF12, PF16, PF28, كانت كثافتها اقل عند الرقم الهيدروجيني 6، اما عند الرقم الهيدروجيني 10 فكان نمو العزلات ضعيف جدا اما العزلات PF21, PF12, PF28, المعزولة من الجت والبزاليا فلم تظهر اي نمو، اشار (12) ان العزلة المتحملة للحامضية قد تمتلك غشاء سايتوبلازميا ذو نفاذية اكثر للبروتونات وكفاءة اكبر في ضخ البروتونات مثل  $H^+$  ATPase الذي يسمح للبكتريا بالحفاظ على الرقم الهيدروجيني الداخلي قريب المتعادل، وقد عزى (13) الى ان البكتريا راكمت حامض الـ Glutamate عند الرقم الهيدروجيني 5، من جانب اخر فقد وجد (14) ان اغلب العزلات التي حصل عليها نمت على الوسط الزرعي ذو الرقم الهيدروجيني 10 وعزلتان فقط استطاعت النمو عند الرقم الهيدروجيني 5 وتتقارب هذه النتيجة مع ما توصلنا اليه.

### \*النمو في تراكيز ملحية مختلفة:

اظهرت نتائج اختبار تأثير تراكيز ملحية مختلفة في نمو الرايزوبيا ان هناك تباين في تحمل هذه العزلات للملوحة فقد استطاعت عزلة بكتيرية تم الحصول عليها من العقد الجذرية لنبات السيسان النمو

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (10) حضرت مزرعة بكتيرية سائلة للعزلة المنتخبة (PF12) ثم نقل 10مل منها الى انابيب معقمة وحفظت بالتلج لمدة 15دقيقة نبذت بسرعة 4000دورة/دقيقة لمدة 15دقيقة، اهمل الراشح وعلقت الخلايا المترسبة بأضافة 10مل من محلول كلوريد الكالسيوم ثم حفظت بالتلج لمدة 30 دقيقة نبذت مرة اخرى بنفس السرعة والمدة وعلقت الخلايا بـ 0.4مل كلوريد الكالسيوم واضيف لها 20 مايكروليتر من الـ DNA البلازميدي للعزلة (PW7) ثم نقلت الى حمام مائي بدرجة حرارة 42م° لمدة 90ثانية اعيدت الى التلج لمدة دقيقتين، زرعت الخلايا المحولة على وسط YEMA، اختبرت قابلية العزلة المحورة في تحمل الملوحة اذ نمت على نفس الوسط ذو التراكيز (2,4,6,8)% من NaCl.

## النتائج والمناقشة:

### 1-عزل وتوصيف الرايزوبيا:

تم الحصول على 30عزلة لبكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنباتات (البرسيم، الجت، الباقلاء، البزاليا) (صنف محلي) والحليبية *Trigonella coerulescens* والقرط *Medicago polymorpha* والحنديوق *Melilotus indica* والسيسان *Sasbania spp* اظهر الفحص الزرعي لمستعمرات هذه البكتريا بأنها مستعمرات دائرية كاملة الحافة، مخاطية، حليبية او شاحبة اللون، كما اظهر الفحص المجهرى انها سالبة لصبغة كرام، عصوية الشكل وقد استغرق ظهور المستعمرات يومين الى اربعة ايام وأستادا لتصنيف البكتريا الوارد في (11) فان عزلات الرايزوبيا التي تم الحصول عليها تعود للأصناف الآتية:-

1-*Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*

2-*Rhizobium melilotus*

3-*Rhizobium leguminosarum*

4-*Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*

اظهرت نتائج اختبار قطر النمو على وسط YEMA ان هناك تباين في قدرة البكتريا على النمو تحت نفس الظروف تبعا للنوع الواحد من الرايزوبيا او تبعا لنوع النباتات والترب المعزولة منها جدول (1)، فقد ظهر اعلى قطر للنمو 9ملم كانت للرايزوبيا المعزولة من السيسان واقل قطر 2ملم للرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات الحنديوق البري.

صحة هذه النتيجة تم استخلاص DNA المعامل بحامض السالسيك فوجد عدم احتوائها على اي حزمة بلازميدية والصورة (2) توضح ذلك مما يؤكد قابلية هذا الحامض على تحييد البلازميدات اذ يعمل على سحب الايونات الموجبة ثنائية التكافؤ والمهمة في ثباتية الغشاء الخارجي في البكتريا وبالتالي حدوث تغير في نفاذية الغشاء والذي يعمل على تسرب البلازميدات الى خارج الخلية (17).

#### 5-التحول الوراثي:

اظهرت نتائج التحول الوراثي اكتساب عزلة PF12 لصفة تحمل الملوحة بعد انتقال DNA البلازميدي المستخلص من عزلة PW7 والصورة (3) توضح بكتريا الرايزوبيا المحولة وراثيا، وهذا يؤكد ان صفة تحمل الملوحة محمولة على البلازميدات، كما اختبرت كفاءة العزلة المحورة وراثيا في تحمل الملوحة نمت على وسط YEMA الحاوي على تراكيز ملحية مختلفة (2,4,6,8)% وأظهرت النتائج قدرتها على النمو في جميع التراكيز الملحية، ان هذه النتيجة تتفق مع ما وجدته ما وجدته (18) الذي تمكن من نقل صفة تحمل الملوحة لبكتريا الرايزوبيا الى بكتريا *E.coli* لزيادة كفاءة الأخيرة في تحمل الملوحة عن طريق التحول الوراثي.

جدول (1) يوضح نتائج اختبار دليل البروموثامبول وقطر النمو على وسط

#### YEMA(ملم)

ت	العائل النباتي	العزلة	قطر التغيير في دليل البروموثامبول	قطر النمو على YEMA
1-	برسيم	PF1	26mm	4mm
2-	سيسبان	PW2	40mm	7mm
3-	سيسبان	PW3	45mm	9mm
4-	سيسبان	PW4	9mm	5mm
5-	حليبه	PW5	39mm	5mm
6-	حندقوق	PW6	15mm	4mm
7-	سيسبان	PW7	43mm	8mm
8-	باقلاء	PF8	25mm	3mm
9-	باقلاء	PF9	28mm	7mm
10-	جت	PF10	28mm	6mm
11-	جت	PF11	19mm	4mm
12-	جت	PF12	38mm	8mm
13-	حندقوق	PW13	42mm	8mm
14-	حندقوق	PW14	5mm	2mm
15-	قرط	PW15	8mm	4mm
16-	جت	PF16	44mm	7mm
17-	باقلاء	PF17	9mm	3mm
18-	برسيم	PF18	15mm	5mm

عند التركيز الملحي 8%، واستطاعت ثلاث عزلات اخرى من النمو عند التركيز الملحي 6% احدها معزولة من العقد الجذرية للسيسبان والأخرى من نبات الحندقوق البري والثالثة من العقد الجذرية لليزاليا، كما استطاعت جميع العزلات من النمو عند التراكيز الملحية 1%، 2%، 4% من جانب اخر لم تظهر اي عزلة قدرة على النمو في التركيز الملحي 10%، ويتفق هذا مع ما وجدته (14) الذي لم يستطع الحصول على اية عزلة نامية عند التركيز الملحي 10% كما ان جميع العزلات استطاعت النمو عند التركيز الملحي 4%.

ويمكن ان تعزى قابلية تحمل بعض عزلات الرايزوبيا لتراكيز ملحية عالية الى انتاجها كمية اضافية من Extracellular polysaccharides او حدوث تغيير في تركيب الـ Lipopolysaccharides لجدار الخلية البكتيرية كما اشار (15) ان الرايزوبيا تستخدم اليات عدة للتاقل ضد الأزموزية وذلك بتراكم Glutamate.

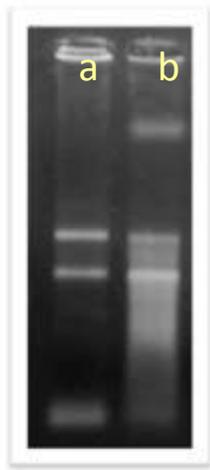
#### 3-عزل DNA البلازميدي:

درس المحتوى البلازميدي للعزلتين المنتخبتين (PW7, PF12) واظهرت النتائج احتواء عزلة PW7 على حزمتين بلازميديتين صغيرتي الحجم اما عزلة PF12 فقد احتوت على حزمتين بلازميديتين صغيرتي الحجم وبلازميد اخر كبير الحجم كما موضح في صورة (1).

يظهر من هذه النتيجة ان كلا العزلتين قد تشابهتا في احتوائهما على بلازميدي صغيري الحجم ولكن ظهر اختلاف في احتواء العزلة PF12 على بلازميد كبير الحجم وقد اشار (16) الى انه ليس هناك علاقة وثيقة بين عدد الحزم البلازميدية وتركيز كلوريد الصوديوم الذي تتحملة العزلات البكتيرية.

#### 4-تحييد الـ DNA البلازميدي:

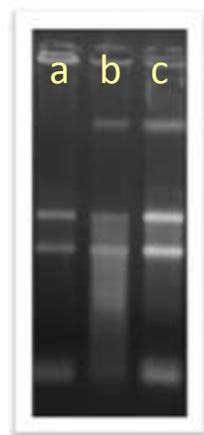
اظهرت نتائج اضافة ستة تراكيز من حامض السالسيك عدم وجود تأثير للحامض على نمو العزلتين عند التركيز (50% و 100%) مايكروليتر وهذا يتفق مع ما ذكره (9) من انه ليس للتراكيز المنخفضة للحامض اي تأثير في نمو العزلات البكتيرية، ودرس تأثير تركيز 150 مايكروليتر من حامض السالسيك بزراعة العزلتين على وسط YEMA الحاوي على التراكيز الملحية (0%، 4%، 8%) وتبين عدم قدرة العزلات على النمو عند التراكيز الملحية (4%، 8%) ومن هذا نستنتج بأن صفة تحمل الملوحة محمولة على البلازميدات ولاجل اثبات



صورة (1) المحتوى البلازميدي لبكتريا الرايزوبيا a-عزلة السيسبان PW7 -  
bعزلة الجت PF12



صورة (2) عزلات الرايزوبيا المحيطة بحامض السالليك. a-عزلة السيسبان  
b-عزلة الجت PF12 PW7



صورة (3) عزلات الرايزوبيا a-عزلة السيسبان PW7/b-عزلة الجت  
c-عزلة الجت المحورة وراثيا PF10

ت	العائل النباتي	العزلة	قطر التغيير في دليل البريوموثايمول	قطر النمو على YEMA
-19	باقلاء	PF19	34mm	6mm
-20	بزاليا	PF20	24mm	7mm
-21	بزاليا	PF21	41mm	8mm
-22	حليبه	PW22	7mm	1mm
-23	حليبه	PW23	16mm	3mm
-24	قرط	PW24	38mm	8mm
-25	قرط	PW25	20mm	5mm
-26	برسيم	PF26	22mm	3mm
-27	بزاليا	PF27	13mm	5mm
-28	جت	PF28	32mm	6mm
-29	سيسبان	PW29	14mm	4mm
-30	خندقوق	PW30	18mm	6mm

جدول (2) نتائج اختبار نمو عزلات الرايزوبيا في درجات حراره مختلفه

ت	رمز العزلة	درجة الحرارة م°				
		45	40	35	25	20
-1	PW3	-	+	+++	+++	+
-2	Pw13	-	++	+++	+++	+
-3	PW7	+	++	+++	+++	++
-4	PF12	-	++	+++	+++	+
-5	PF28	-	+	+++	+++	+
-6	PF16	-	+	++	+++	+
-7	PF21	-	++	++	+++	+
-8	PW24	-	+	+++	+++	-

+++نمو كثيف، ++ نمو جيد، + نمو ضعيف، - عدم وجود نمو

جدول (3) نتائج اختبار تحمل عزلات الرايزوبيا للظروف القاعديه والحامضيه

في وسط YEMA

ت	رمز العزلة	الاجهاد الحامضي والقاعدي (pH)					
		10	9	8	7	6	5
-1	PW3	+	++	+++	+++	+++	+
-2	PW13	+	++	+++	+++	+++	-
-3	PW7	+	++	+++	+++	+++	+
-4	PF12	-	++	+++	+++	++	+
-5	PF28	-	++	+++	+++	++	-
-6	PF16	+	++	+++	+++	++	-
-7	PF21	-	++	+++	+++	+++	+
-8	PW24	+	++	+++	+++	+++	+

جدول (4) نتائج اختبار تحمل عزلات الرايزوبيا للملوحه

ت	رمز العزلة	التركيز الملحي					
		%10	%8	%6	%4	%2	%1
-1	PW3	-	-	+	++	+++	+++
-2	PW13	-	-	+	++	++	+++
-3	PW7	-	+	++	++	+++	+++
-4	PF12	-	-	-	++	+++	+++
-5	PF28	-	-	-	+	+++	+++
-6	PF16	-	-	-	+	+++	+++
-7	PF21	-	-	+	++	+++	+++
-8	PW24	-	-	-	+	+++	+++

- 10-Sambrook,J.;Fritgah,E.and Maniatis,T. (1989).molecular cloning.laboratory manual.Cold Spring Harbour Laboratory. Newyork.
- 11-Rhijn,P.and Vanderleyden, J.(1995).the Rhizobium plant symbiosis. Microbiological Reviews.Mar.59(1);124-142.
- 12-Mensah,J.K.;Esumeh,F.;Lyamu,M.and Omoifo,C(2006). Effects of different salt on centration and PHon groth of Rhizobium sp. American. Eurasion J.Agric& Environ. Sci. 1(3);198-202.
- 13-Watkin,E.L.Ohara,G.W.and Glenn,A.R. (2003).physiological responses to acid stress of an acid soil tolerant and an acid soil sensitive strain of Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii. Soil Biol.Biochem.35;621-624.
- 14-Kucuk,K.;Kivanc,M.;and Engin,K. (2006).characterization of Rhizobium sp. Isolated from bean.Turk J Biol.30;124-132.
- 15-Abdel-salam,M.S.;Ibahim,M.M.,Abdel-Halim,F.M.; and Badawy,S.E. (2010). phenotypic characterization of indigenous egyption Rhizobial strains for stresses performance. Journal of American Science.6(9);498-503.
- 16-Garatezi,S. and Ahmad, D. (2001). biodiversity and performance of Rhizobia in relation to plasmid genes and their transformation products.Journal of Biological Sciences.1(12) ;1134-1137.
- 17-الحسيني، انوار علي عبدالله،(2005). دراسة بكتريولوجية ووراثية على البكتريا المسببة لحب الشباب،رسالة ماجستير-كلية العلوم-جامعة بابل.
- 18- Fox, M.A. (2005). Adaptation of Rhizobium to environmental stress. degree of Doctor of philosophy ,university of Reading.
- المصادر
- 1-Sessitsch,A.Howieson,J.G.;Perret, X.and Amtoun,H.(2002).advances in *Rhizobium* research. Critical Reviews in plant Scienes. 21(4);323-358.
- 2-Keneni,A.;Assefa,F. and Prabu,C.P.(2010). Characterization of acid and salt tolerant Rhizobial strains isolated from Faba Bean Fields of wollo. Northren Ethiopia.J. Agr. Sci. Tech.12;365-376.
- 3-Shameseldin,A.and Werner,D.(2005).high salt and high PH tolerance of new isolated Rhizobium etli strains from egyption soils. Current Microbiol.50(1);11-16.
- 4-Shameseldin,A.;Nyalwidhe,J.and Werner ,D.(2006).aproteomic approach to wards the analysis of salt tolerance in Rhizobium etil and Sinorhizobium meliloti strains. Current Microbiol.52(5);333-339.
- 5-Adal,M.(2009).phenotypic and symbiotic characterization of grass pea (*Lathyrus sativus*) rhizobial isolates from some major growing areas of south wollo and west shoa, Ethiopia.Addis Ababa University.Masters of Science in Biotechnology.
- 6--Afrasayab , S.; Faisal, M. and Hsamain,S. (2010). comparative study of wild and transformed salt tolerant bacterial strains of *Triticum aestivum* growth under salt stress.Bra. J. Micro. 41; 946-955.
- 7-Shamseldin,A.(2008).plasmid content of salt stress-tolerant Rhizobium strains from egyption soils nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).World J.Microbiol Biotchnol.24;1603-1606.
- 8-Beck,D.P.;Materon,L.A.; and Afnadi, F. (1993).practical Rhizobium legume technology manual. Technical Manual.19; ICARDA.
- 9-Domenico,P.;Schwatz,S.;and Cunha, B. (1989).reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumonia* by sodium salicylate.J.Infect.Immun.57;3778-3782.

## INVESTIGATING RHIZOBIUM BACTERIA AND OBTAINING SALINITY TOLRANCE ISOLATES USING GENETIC TRANSFORMATION METHOD

DHAFER F. ABD-AL-KADER

SHAIMA'A KH. OTHMAN

### ABSTRACT

This study was conducted to isolate *Rhizobium* from the roots of wild and field cereal plants (*Trifolium* spp., *Medicago sativa*, *Ficia vaba*, *Pisum sativum* , *Medicago polymorpha* L., *Melilotus indica* (L.) ALL , *Sesbania* spp. , )*Trigonella coerulescens* M.Bieb ) ,30 isolates strains from plants roots were obtained , 15 from wild cereal and 15 from field cereal, The most efficient nitrogen fixing 8 isolates have been selected on the basis of the diameter of the colony and that of the change of the blue color of the medium of the promothymol blue indicator YEMA-BTB.The optimal conditions for the development of the selected isolates have been studied in terms of temperature, pH and their endurance of the salinity of the medium. Consequently, the best wild isolate,PW7 is taken from wild *Sesbania* the best field isolate designated PF12 isolated from *Medicago sativa* , the genetic content of these selected strains were studied, the results showed that the two strains contain small plasmide bands, PF12 strains contains an additional large plasmide band, in order to study the role of these plasmids in the genetic experiment was conducted to neutralize these plasmids by using salsalic acid, results showed that the neutralize cells lost their salinity resistance when tested on a YEMA medium with varying concentrations , genetic transformation was conducted by carrying the DNA extracted from strain PW7 into strain PF12.results showed the transference of the plasmids from PW7 to PF12 which transferred the salinity resistance trait. This has been confirmed by re-culturing the transformed isolate onto the YEMA medium with different salinity concentrations. The modified isolate could grow in a salinity concentration of 8% NaCL.