استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا (RAPD) في الكشف عن التباين الوراثي لعزلات من بكتريا العقد الجذرية (*Sinorhizobium meliloti*) المعزولة من الترب العراقية

حرب عادل عبد محمد* نضال نعمة حسين** علي عبد الرحمن طه***

الملخص

تضمنت الدراسة عزل عشر عزلات من بكتريا ***Sinorhizobium meliloti***، تم عزلها من العقد الجذرية لنباتات الجت التي جمعت من مناطق مختلفة من العراق، فضلاً عن اربع عزلات اضافية تم الحصول عليها من مصادر اخرى. وتمت تنقيتها وتشخيصها واختبار تحمل هذه العزلات لتراكيز متزايدة من ملح NaCl، وبينت النتائج تبايناً في تحمل العزلات لتراكيز مختلفة من ملح NaCl فكانت ثلاثة منها متحملة الى غاية 6% وهي Sm8، Sm10 وSm12، وعزلة واحدة كانت ضعيفة التحمل وهي Sm1 تحملت 1.5%، بينما كانت بقية العزلات متوسطة التحمل حيث تراوحت قابليتها لتحمل الملح بين هذين التركيزين.

اعتماداً على نتائج تحمل العزلات للملح اختيرت اربع عزلات احدها عالية التحمل للملح Sm10 والاخرى ضعيفة التحمل للملح Sm1، واثنتين متوسطة التحمل Sm6، Sm9 لتطبيق مؤشرات التفاعل التضاعفي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random Amplified of Polymorphic DNA (RAPD) على الدنا الكلي المعزول من العزلات الاربعة بأستخدام تسع عشرة بادئةً، خمسة منها لم تعط نتائج مع دنا عزلات بكتريا العقد الجذرية (الرايزوبيا)، اما الاربع عشرة بادئةً الاخرى فقد انتجت ما مجموعه اربع وسبعين حزمة متضاعفة، من بينها ثلاث بادئات (OPA01, OPA15, OPA16)، اعطت حزماً متماثلة في العدد والوزن الجزيئي للعزلات جميعها (Monomorphic bands)، بينما الاحدى عشرة بادئةً الباقية انتجت حزماً متباينة في العدد والوزن الجزيئي (Polymorphic bands) وبلغت ثلاثين حزمة، التي تم الاعتماد على نتائجها في الكشف عن التباين الوراثي بين عزلات بكتريا الرايزوبيا المتباينة في تحملها للملوحة، واظهرت النتائج ان البادىء OPJ18 كان اعلى كفاءة بين البادئات المستخدمة في انتاج الحزم، إذ بلغت 17.6%، اما البادىء OPA15 فكان الاقل كفاءة في انتاج الحزم إذ بلغت 1.3%. وكان البادىء OPC16 اعلى قدرة تمييزية في انتاج الحزم المتباينة إذ بلغت 20%، اما البادىء OPR17 فكان الاقل قدرة تمييزية وبلغت 3.3%. واظهرت النتائج ايضا ان البادئات جميعها استطاعت ان تنتج حزماً مميزة لواحدة او اكثر من العزلات قيد الدراسة، ماعدا البادئين OPR17 و OPT19، فأنها اظهرت حزما مشتركة بين اثنتين من العزلات ولم تنتج حزماً مميزة.

المقدمة

ولدت الزيادة المستمرة في مجاميع السكان والحيوان، وحاجتهم الماسة الى الطعام والعلف ضغطاً كبيراً على النظام البيئي الزراعي (36) فأصبحت هناك حاجة لزيادة المساحات المزروعة، ولكن هذه الزيادة تواجه مشكلة مهمة وهي زيادة رقعة الاراضي الجافة وشبه الجافة، إذ انها تحتل ما يقارب ثلث مساحة الاراضي في العالم، إذ أصبح من الصعوبة الاستفادة منها اقتصادياً لانها تمتاز بالحرارة العالية وقلة الرطوبة النسبية وزيادة التبخر وقلة الامطار، فضلاً عن

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

* المركز الوطني للزراعة العضوية –وزارة الزراعة– بغداد، العراق.

** كلية التربية/ابن الهيثم –جامعة بغداد– بغداد، العراق.

*** مركز بحوث التقانة الاحيائية جامعة النهرين– بغداد، العراق.

ذلك فأن هذه الاراضي تتضمن المساحات المالحة التي تمثل نسبة 15% من الاراضي الجافة وشبه الجافة في العالم (45). وبسبب التبخر في بعض الاحيان ترسباً لبعض الاملاح الى مستويات عالية تكون كافية لان تقصي او تزيل كثير من نباتات تلك البيئات (15، 44). من اجل استثمار هذه الاراضي وجب توفير اصناف نباتية متحملة للجفاف والملوحة وظروف البيئة القاسية، ولهذا يعول كثيراً على النباتات البقولية والعلاقة التعايشية بينها وبين بكتريا العقد الجذرية لتحسين هذه البيئات (30)، إذ تستطيع النباتات البقولية تكوين تركيب متخصص تتم فيه عملية تثبيت النايتروجين وهو العقدة الجذرية التي هي ناتج تفاعل جزيئي بين النبات المضيف والرايزوبيا (12).

تصنف معظم النباتات البقولية على انها انواع محاصيل حساسة للملوحة (13). وبشكل عام تؤثر الملوحة في النباتات البقولية والرايزوبيا وعلى العلاقة التعايشية بينهما من خلال تأثيرها على حيوية وبقاء البكتريا وتكاثرها في التربة وتثبط عملية اصابتها لجذر النبات التي تمنع تكون العقد الجذرية التي تؤثر في وظيفة العقدة الجذرية مقللة نمو النبات والتركيب الضوئي، كما تسبب انخفاضاً في وزني النبات والعقد الجاف وكذلك في عدد العقد الجذرية (9، 39).

أن التنوع الوراثي في الرايزوبيا الطبيعية الموجودة في التربة مثل ***S. meliloti*** قد تم بحثه بأستعمال طرائق مختلفة لتنميط العزلات ومنها طريقة التنميط المصلي (Syrotypping) إذ استعملت لتشخيص العزلات وكذلك في الكشف عن العلاقة بين العزلات المعزولة من مناطق جغرافية مختلفة (20). ومقارنة المقاومة للمضادات الحياتية (8) وكذلك استخدام المركبات المختلفة لمعرفة قابلية استخدامها من قبل البكتريا كمصادر للكاربون (37). لكن تلك التقانات جميعها وغيرها لا تكشف عن التغاير الحقيقي على مستوى المادة الوراثية لهذا تعد الطرائق والتقانات الجزيئية من احسن الطرائق في التمييز لغرض تحديد التغاير بين السلالات والعزلات في البكتريا (38)، فكان من هذه الطرائق الكشف عن البلازميدات بالترحيل الكهربائي (7) ولكن ما يحدد الاعتماد على البلازميدات في تفسير التغاير بين مجاميع الرايزوبيا هو انها قد تنتقل من خلية لاخرى وقد تفقد من الخلية او يعاد اكتسابها وقد يحدث اعادة ترتيب او حذف فيها اثناء المعاملات المختبرية او حتى في البيئة الطبيعية، وان التغاير فيها لايرتبط بالتغاير على الكروموسوم (47)، فكان من الواجب الاعتماد على تقانات ادق مثلاً التغاير في تسلسل الوحدة الثانوية الصغيرة RNA الرايبوسومي (SSU rRNA) (43). اما التقنية التي تعتمد على اهم اكتشافات القرن الماضي فهو تفاعل تضاعف سلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) (23)، التي مهدت لتطوير انواع عديدة من مؤشرات الدنا ومنها مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random Amplified of Polymorphic DNA (RAPD) التي استنبطت عام 1990 وهي من اوائل المؤشرات المعتمدة على تفاعل PCR واخذت حيزاً كبيراً في التطبيق لأنها دقيقة وسريعة وسهلة وغير مكلفة (42). لقد وجد ان هذه الطريقة مفيدة للتمييز بين السلالات المتقاربة بشدة من الرايزوبيا (26). لهذا اعتمدت هذه المؤشرات في هذه الدراسة للكشف عن التباين الوراثي بين عزلات الرايزوبيا المتباينة في تحملها للملح.

المواد وطرائق البحث

الكشف عن عزلات بكتريا الرايزوبيا المتحملة للملوحة

العزلات البكتيرية المستخدمة

تم عزل وتشخيص عشر عزلات محلية من بكتريا ***Sinorhizobium meliloti*** من العقد الجذرية لنبات الجت alfalfa (***Medicago sativa*** L.) من مناطق مختلفة من محافظة بغداد، اضافة الى عدد من المحافظات

الاخرى. وكذلك تم الحصول على عزلتين محليتين (3) وعزلتين احداهما محلية والاخرى غير محلية (وزارة الزراعة/ الهيأة العامة للبحوث الزراعية) التي تم اعطاؤها رموز مثل باقي العزلات من اجل توحيدها، كما موضح في الجدول (1).

جدول 1: مصادر العزلات البكتيرية

مصدر العزلة	رمزها
بغداد– ابو غريب	Sm5
– الاعظمية/حديقة كلية التربية	Sm13
– الجادرية	Sm14
الانبار– الفلوجة1	Sm3
– الفلوجة 2	Sm4
– الرمادي	Sm9
بابل – الحلة	Sm6
السليمانية	Sm1
صلاح الدين– الطارمية	Sm2
– بلد	Sm10
– ابوغريب	Sm12
– عزلة غير محلية(510)	Sm11
– ابو غريب IsnB	Sm8
– ديالى IsnD	Sm7

عزل وتشخيص وحفظ بكتريا العقد الجذرية

عزلت بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنباتات الجت جيدة النمو التي تم جمعها من مناطق مختلفة من العراق، حسب الطريقة الموصوفة من قبل Vincent (40). وبعد ظهور المستعمرات البيضاء او حليبية اللون تزرع مرات عدة بطريقة التخطيط على اطباق بتري حاوية على وسط MSY الصلب لتنقيتها ثم تحفظ في انابيب خاصة vials حاوية على الوسط الزراعي نفسه وتحفظ في درجة حرارة 4 مْ.

اختبار تحمل العزلات البكتيرية لظروف الشد الملحي

تمت اضافة اوزان متصاعدة من ملح كلوريد الصوديوم النقي، الى الوسط الزراعي MSY الصلب، قبل التعقيم بواقع الاوزان من 0.5 الى 6.0 غرام في 100 مليلتر من الوسط وبفارق 0.5 غرام لكل معاملة. زرعت العزلات بطريقة التخطيط على الاطباق ثم حضنت في حاضنة على درجة حرارة 28±2 مْ لمدة 2–3 ايام وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز اضافة الى السيطرة التي تم زرع البكتريا فيها في الوسط الخالي من الملح (32).

عزل DNA المجيني من بكتريا العقد الجذرية

تم عزل الدنا المجيني من الرايزوبيا بطريقة الاستخلاص الملحي Salting out الموصوفة من قبل Pospiech وNewman (28).

عملية الترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز

تمت عملية الترحيل الكهربائي حسب ما ذكر في Maniatis وجماعته (19).

اعداد تفاعلات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا (RAPD)

تم اعداد هذه التفاعلات حسب ما ذكر في **Williams** وجماعته (**42**)، وتوصيات الشركات المجهزة لبعض مواد التفاعل، حيث يتكون خليط التفاعل من التراكيز النهائية التالية وبحجم **25** مايكروليتر لكل عينة (محلول منظم **PCR buffer 1x**، **200 dNTPs** مايكرومولر/ لكل قاعدة، بادئ **10 primer** بيكومول، انزيم بلمرة الدنا **1.25** وحدة انزيمية، الدنا القالب **20- 50** نانوغرام/مايكروليتر، يكمل الحجم بالماء المقطر المعقم). تمزج المواد جيداً مع مراعاة ترك عينة السيطرة بدون دنا، توضع العينات في الجهاز المبلمر الحراري الحلقي ويبرمج الجهاز لينفذ البرنامج التالي (**94** مْ لمدة **2** دقيقة ودورة واحدة، ثم كل من **92** مْ دقيقة واحدة، **36** مْ دقيقة واحدة و**72**مْ دقيقتين، لاربعين دورة، ثم دورة واحدة **72**مْ لعشر دقائق)، ترفع العينات بعد انتهاء البرنامج وتحفظ في درجة حرارة **4**مْ او تحضر مباشرة لتحميلها على هلام الاكاروز بتركيز **1.2**%.

تحليل نتائج مؤشرات RAPD

يتم حساب الحزم الناتجة من عملية التضاعف من خلال دراسة وتحليل صور الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز، بحيث يوضع الرمز (+) دلالة على وجود الحزمة والرمز (−) دلالة على غياب الحزمة وترتب في جدول يوضح العزلات وارقام الحزم ووجودها وغيابها، إضافة الى اوزانها الجزيئية وكذلك يتم حساب النسبة المئوية لكفاءة البادئات المستخدمة **Primer efficiency** من خلال المعادلة:

كفاءة الباديء = العدد الكلي لحزم الباديء / العدد الكلي لحزم كل البادئات **x 100** %

ثم تم استخراج النسبة المئوية للقدرة التمييزية لكل باديء من خلال المعادلة الآتية:

عدد الحزم المتباينة للباديء/ عدد الحزم المتباينة لكل البادئات **x 100** % (**14**)

علماً ان كل حزمة ظهرت في عينة السيطرة **C** قد اهملت وذلك لان انزيم البلمرة المستخدم في هذه الدراسة من نوع **Amplitaq ® DNA polymerase**، ويكون ملوث بدنا بكتريا الـ ***E. coli*** لذلك تستعمل السيطرة **C** لتلافي التداخل الذي يمكن ان يحدث (**31**).

النتائج والمناقشة

اختبار تحمل عزلات بكتريا العقد الجذرية للشد الملحي

اظهرت نتائج اختبار تحمل عزلات الرايزوبيا للشد الملحي، بأستخدام ملح **NaCl** ، تبايناً واضحاً في تحمل العزلات للملح، إذ ان العزلة **Sm1** (سليمانية) كانت اقل قدرة على تحمل الملح وبلغت درجة تحملها **1.5**%، اما العزلات **Sm8**،**Sm10** و**Sm12** ، فانها تحملت اعلى تركيزاً من الملح، حيث تحملت لغاية **6**%، اما باقي العزلات فتدرجت بين ذلك حيث تحملت العزلات **Sm2**، **Sm4**، **Sm5** و**Sm6** تركيز **2.5**% من ملح **NaCl**، في حين اشتركت العزلات **Sm3**، **Sm7**، **Sm9**، **Sm13** و**Sm14** بتحملها لتركيز **3**% من ملح **NaCl** والعزلة **Sm11** تحملت **3.5**% من **NaCl**، كما موضح في جدول (**2**).

تم اختيار اربع عزلات التي سيتم اجراء تفاعلات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال عليها مع مراعاة تنوع مستويات تحملها للملح وكذلك مراعاة توزيعها الجغرافي فيما يخص مكان الحصول عليها من مناطق مختلفة من محافظات العراق، ولأن هذه العزلات الاربعة كانت ذات نمو جيد، كما هو موضح في جدول (**3**).

جدول 2: مستويات تحمل عزلات بكتريا *Sinorhizobium meliloti* لتراكيز مختلفة من ملح NaCl

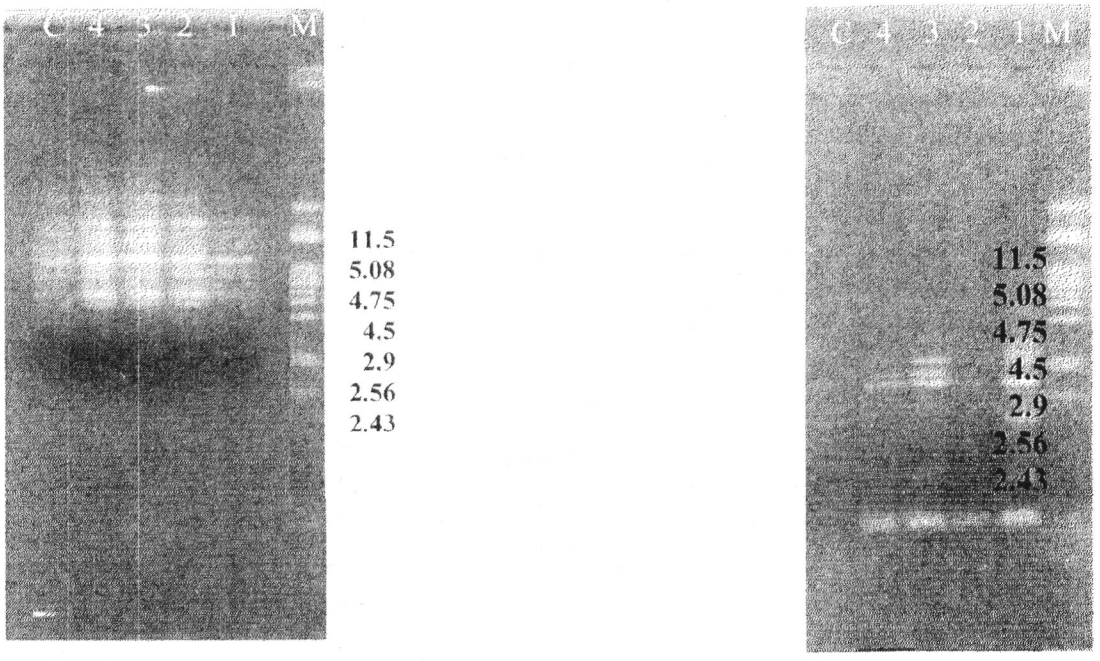
اسم العزلة	موقعها	تركيز ملح NaCl%
Sm1	السليمانية	1.5
Sm2	الطارمية	2.5
Sm3	الفلوجة 1	3
Sm4	الفلوجة 2	2.5
Sm5	ابو غريب	2.5
Sm6	الحلة	2.5
Sm7	ديالى	3
Sm8	ابو غريب/السيد ابراهيم	6
Sm9	الرمادي	3
Sm10	بلد	6
Sm11	عزلة غير محلية510	3.5
Sm12	ابو غريب/د.امل	6
Sm13	حديقة كلية التربية/ابن الهيثم	3
Sm14	الجادرية/جامعة بغداد	3

جدول 3: العزلات التي تم اعتمادها في مراحل البحث اللاحقة

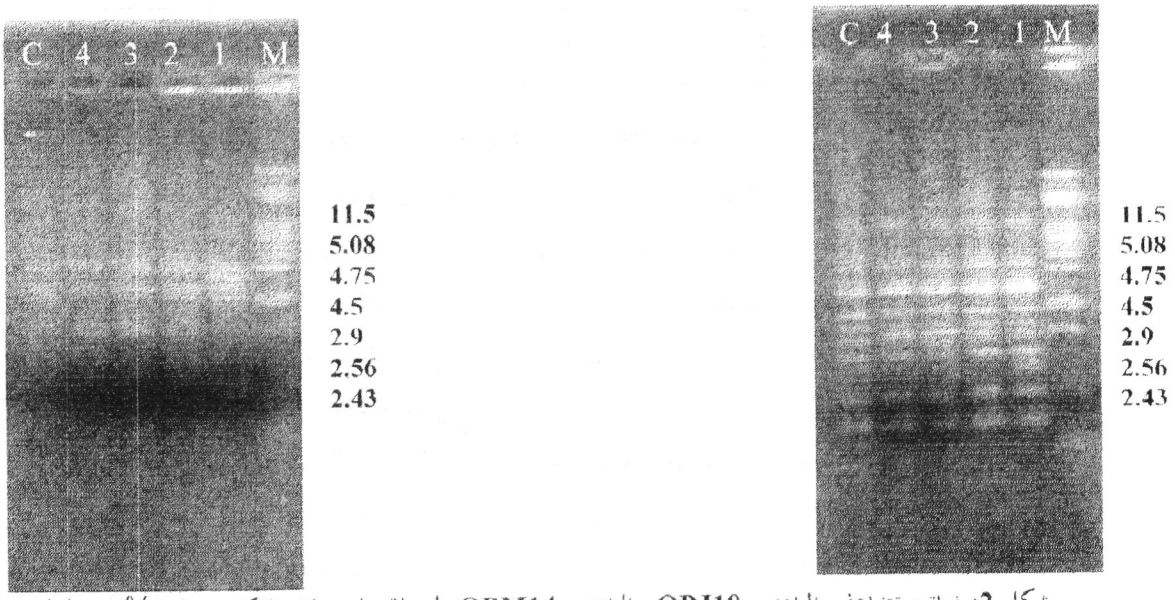
اسم العزلة	موقعها	مستوى تحملها من NaCl %	نوعها
Sm1	السليمانية	1.5	ضعيفة التحمل
Sm6	الحلة	2.5	متوسطة التحمل
Sm9	الرمادي	3	متوسطة التحمل
Sm10	بلد	6	عالية التحمل

تفاعلات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة DNA

بعد دراسة وتحليل نواتج تفاعلات RAPD، يمكن ان نلاحظ ان نواتج التضاعف تنوعت من حيث اختلاف عدد الحزم المتضاعفة الناتجة واوزانها الجزيئية بين العزلات قيد الدراسة وحسب البادئات التي استخدمت في تطبيق مؤشرات RAPD. التي هي تسع عشرة بادئة، ثلاث منها 15.6% من مجموع البادئات المستخدمة، لم تظهر اي نواتج تضاعف عند تطبيقها مع دنا عزلات بكتريا الرايزوبيا، وشملت كل من البادئات OPB20، OPC06 وOPE04. اما البادئتان OPA03، OPD13 التي تمثلان 10.5% من مجموع البادئات المستخدمة فقد اظهرت كل منها نواتج تضاعف ولكن هذه النواتج كانت غير واضحة ومن الصعوبة تحليلها ودراستها، لأن الحزم المتضاعفة الناتجة اما انها كانت باهتة او ظهرت مسحة مرافقة لها بحيث يصعب تمييزها ودراستها، ولهذا فأنه تم استبعاد نواتج هذه البادئات عند تحليل نواتج مؤشرات RAPD. اما البادئات التي اعطت نواتج تضاعف كاملة وواضحة ومتنوعة فشملت 14 بادئةً 74% من مجموع البادئات المستخدمة، وهذه المجموعة تميزت الى مجموعتين من النتائج وهي المجموعة التي اظهرت نواتج تضاعف متماثلة monomorphic bands pattern حيث ان الحزم الناتجة كانت متماثلة العدد والموقع بين عزلات دنا بكتريا الرايزوبيا كافة قيد الدراسة وهي ثلاث بادئات OPA01, OPA15, OPA16 التي انتجت مجموعة 9 حزم متماثلة العدد والوزن الجزيئي. اما المجموعة الثانية التي اظهرت نواتج تضاعف متباينة polymorphic band pattern فهي احدى عشرة بادئةً انتجت ماجموعه 59 حزمة مختلفة في العدد والوزن الجزيئي بين دنا العزلات قيد الدراسة كما في شكل (1) الذي يوضح نواتج التضاعف للباديء OPC16 والباديء OPN16 وشكل (2) يوضح نواتج التضاعف للباديء OPC18 والباديء OPM14، وجدول (3) الذي يمثل الحزم متباينة الظهور مع اوزانها الجزيئية للباديء نفسه.



شكل 1: يمثل نواتج تضاعف البادىء OPC16 وOPN16 المرحلة على هلام الاكاروز، 1.2% مع الدليل الحجمي (M) دنا λ المقطع بالإنزيم *PstI*، إذ (Sm1-1، Sm6-2، Sm9-3، Sm10-4، C- السيطرة).



شكل 2: نواتج تضاعف البادىء OPJ18 والباديء OPM14 المرحلة على هلام الاكاروز 1.2% مع الدليل الحجمي (M) دنا λ المقطع بالإنزيم *PstI*، إذ (Sm1-1، Sm6-2، Sm9-3، Sm10-4، C- السيطرة)

اختبار تحمل عزلات بكتريا العقد الجذرية لظروف الشد الملحي

تواجه الرايزوبيا الشد الملحي بأن تسمح بتدفق الأملاح أو المواد الذائبة إلى داخل الخلية أو تخليق مواد ذائبة عضوية عديدة تدعى **Osmolytes** مثل **Glutamate**، إذ يسبب ارتفاع مستوى ملح **NaCl** إلى **400** ملي مولر في بكتريا ***S. meliloti***، ارتفاع مستوى **Glutamate** مثلا إلى **6** أضعاف أكثر من الحالة الطبيعية (6)، ومن خلال دراسة وتحليل نتائج تحمل عزلات بكتريا الرايزوبيا للشد الملحي، نجد ان العزلات المختلفة اظهرت تنوعاً في تحملها لملح

NaCl وان هذا التنوع ناتج من تنوع مصادر العزلات إذ يشير Jenkins (17) الى ان الرايزوبيا المعزولة من ترب غير متأثرة في الملح تكون حساسة للملوحة، اما المعزولة من ترب مالحة فتكون متحملة وذات صفات افضل من الحساسة، كذلك تشير الدراسات الى التباين في تحمل العزلات للملوحة، إذ وجد Zahran وجماعته (46) ان العزلات المختلفة من الرايزوبيا المعزولة من الباقلاء والترمس والبرسيم كانت متباينة في درجة تحملها للشد الملحي. وكذلك وجد الدركزلي (2)، تبايناً في تحمل عزلات الرايزوبيا المعزولة من الباقلاء للملح. ومن النتائج نجد ان كل من العزلات Sm8، Sm10 وSm12، قد تحملت حتى 6% من ملح NaCl ، وان هذه النتائج تطابق ماجاء في المصادر العلمية، إذ يذكر Lloret وجماعته (18) ان السلالة EFB1 من *S. meliloti* قد تحملت حتى 300 ملي مولرمن ملح NaCl ، واشار Jebara وجماعته (16) الى انه حصل على 4 عزلات من *S. meliloti* المتحملة لملح NaCl بتركيز 700 ملي مولر من ضمن عينات عزلت من ترب متأثرة في الملوحة في تونس، وذكر Shamseldin وWarner (33)، انه حصل على سلالتين من *Rhizobium etli* تحملت 4% من ملح NaCl ضمن سبع سلالات عزلت من ترب متأثرة في الملح في مصر، وكذلك وجد Payakapong وجماعته (26) ان السلالة BL3 من *Sinorhizobium* sp. التي استعملها لتشخيص مجاميع الجينات الخاصة بتحمل الملوحة قد تحملت ملح NaCl بتركيز 600 ملي مولر، اما Soussi وجماعته (34) فأشار الى تحمل عزلة *Mesorhizobium ciceri* الى 200 ملي مولر من NaCl.

تفاعلات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة DNA

بعد عرض نتائج تفاعلات RAPD، فأن مجموعة من البادئات التي لم تظهر نواتج تضاعف، عند تطبيقها مع دنا عزلات الرايزوبيا، وقد يعود السبب في فشل هذه البادئات في اظهار نواتج تضاعف، الى عدم وجود التتابعات المكملة لتلك البادئات ضمن مجين عزلات بكتريا الرايزوبيا قيد الدراسة (41). اما المجموعة الثانية من البادئات التي اظهرت نواتجاً غير واضحة وغير قابلة للتحليل والدراسة، فأن السبب في هذه الحالة يعود احيانا الى بعض حالات السهو والاخطاء الشخصية عند عمل خليط التفاعل وربما خلط غير متجانس لمكونات التفاعل، وفي هذه الحالة تتم اعادة تجربة هذه البادئات للتأكد من انه ليس خطأ تجريبي، وهذا ماتم في هذه الدراسة وإلا فأن هذه البادئات كما يذكر Ahmad (5) تحتاج الى ضبط خاص لظروف تفاعل كل واحد منها على حدة. فيما يخص المجموعة التي اظهرت نواتج تضاعف متماثلة ومشتركة (Monomorphic bands) في العدد والموقع عند تطبيقها مع دنا عزلات الرايزوبيا، وهذا يعني ان هذه البادئات قد وجدت تتابعات مكملة لها ضمن المجين كانت متشابهة ومشتركة للعينات جميعها، وهذه ظاهرة واردة ومعروفة مع مختلف الكائنات الحية (1، 4، 25)، وبما ان احد اهداف هذه الدراسة هو الكشف عن التباينات الوراثية بين عزلات الرايزوبيا المتباينة في تحملها للملوحة، لذا فأنه لم يتم التركيز على هذه النتائج بالرغم من اهميتها في العديد من الدراسات التي تهدف الى تحديد العلاقات الوراثية واهداف اخرى كثيرة (25). عليه كانت البادئات التي اظهرت نواتج تضاعف متباينة هي التي اعتمد عليها لتحقيق هدف الدراسة في الكشف عن التباين الوراثي بين عزلات الرايزوبيا المتباينة في تحملها للملح. يتم الاعتماد على ثلاثة اسس عند تحليل نواتج اي نوع من مؤشرات الدنا ومنها تقنية RAPD، وهي:

1- وجود او عدم وجود (Present/ absent) حزمة دنا معينة بأستخدام باديء معين.

2- عدد واوزان هذه الحزم (Number & Molecular weight of bands).

3- الاختلاف في شدة التآلق بين حزمتين من الوزن الجزيئي نفسه (Band intensity) (11). ومن الجدير بالذكر ان شدة تآلق الحزمة لم يعتمد أساساً للتباين في هذه الدراسة، لأن من الصعوبة ضبط التركيز الدقيق للدنا القالب، بحيث

يمكننا ارجاع سبب الاختلاف في شدة التآلق الى الاختلاف في عدد نسخ تتابع معين. أن كل تتابع مكمل للباديء على المجين يؤدي الى ظهور حزمة على هلام الآگاروز، فيكون عدد الحزم الناتجة بعدد التتابعات المكملة للباديء التي يتعرف عليها الباديء، لاكمال عملية التضاعف، وان غياب اية حزمة في عزلة او صنف او أنموذج معين مقارنة بآخر هو افتقار لموقع ارتباط الباديء، وعلى هذا الاساس يتم حساب التباينات بين الافراد والانواع والاصناف والجماعات وما الى ذلك (42).

وبعد تحليل نواتج تفاعلات RAPD، بخصوص نواتج البادئات التي اظهرت التباين (11 بادئا)، فأن هذه البادئات جميعها كشفت عن وجود تباين بين عزلات الرايزوبيا قيد الدراسة، إلاّ ان البادئات قد اختلفت في قدرتها على اظهار التباين، فمن خلال حساب القدرة التمييزية لكل باديء حُسبت المعادلة المذكورة في طرائق العمل كان للبادي OPC16 اعلى قدرة تمييزية بلغت 18.7% من مجموع البادئات التي اظهرت تبايناً، اما الباديء OPR17 فكان له اقل قدرة تمييزية بلغت 3.1% (14). وكذلك تم حساب كفاءة البادئات من حيث قابليتها على اظهار اكبر عدد ممكن من الحزم الكلية، مثلاً كان الباديء OPJ18 قد اظهر عددا من الحزم تتراوح بين 10- 12 حزمة، مما جعل لهذا الباديء كفاءة Efficiency بلغت 16.6% من مجموع اعداد الحزم الناتجة من باقي البادئات، فيما كان الباديء OPA15 هو الاقل كفاءة لأنه انتج حزمة واحدة فقط بحيث انخفضت كفاءته الى 1.3%، ويوضح جدول (4) نواتج البادئات من الحزم مع نسب كفاءتها وقدرتها التمييزية.

جدول 4: يوضح عدد نواتج البادئات من القطع (حزم) مع نسب كفاءتها وقدرتها التمييزية

الباديء	معدل القطع الناتجة	القطع المتباينة	الكفاءة%	القدرة التمييزية%
OPA10	3	2	4.1	6.2
OPA11	4-1	3	5.5	9.3
OPA12	5-4	2	6.9	6.2
OPA15	1	/	1.3	/
OPA16	1	/	4.1	/
OPA11	3-1	2	4.1	6.2
OPA16	6-1	6	8.3	18.7
OPA18	12-10	4	16.6	12.5
OPA14	5-4	2	6.9	6.2
OPA16	8-4	5	11.1	15.6
OPA17	2-1	1	2.7	3.1
OPA19	5	2	6.9	6.2
OPA14	5	3	6.9	9.3

اظهرت نتائج مؤشرات RAPD درجة عالية من التباين الوراثي بين عزلات الرايزوبيا المعزولة من مناطق مختلفة من العراق، إذ ان اختلاف مواقع جمع العينات كان ذا اثر كبير في اظهار هذا التباين الواسع بين العزلات ويوضح جدول (5) حالات التباين المختلفة للعزلات مع البادئات جميعها. يشير Raffetti وجماعته (29)، الى ان الخصائص الكيميائية والفيزيائية لنوعين من التربة، التي عزلت منها الرايزوبيا في دراسته، تكون مسؤولة عن التباين الوراثي بين السلالات. وكذلك وجد Oliveira وجماعته (26)، تغايراً كبيراً بين سلالات الرايزوبيا المعزولة من مناطق مختلفة في البرازيل، بأستخدام تقنية RAPD.

جدول 5: جميع حالات التباين المختلفة للعزلات مع كل البادئات

البادىء	العزلات	الوزن الجزيئي للحزم الظاهرة Kb	الوزن الجزيئي للحزم الغائبه Kb	نوع الحزمة
OPA10	Sm1	4.5	/ 2.1	مميزة مميزة
OPA11	Sm9 Sm6	5 / /	/ 4.8 4.7	مميزة مميزة مميزة
OPA12	Sm9 Sm1	/ /	5 4.6	مميزة مميزة
OPB11	Sm9	11 /	/ 2	مميزة مميزة
OPC16	Sm1 Sm1,Sm3 Sm9 Sm6 Sm1 Sm6	2.45 2.4 2.25 / 2.0 /	/ / / 2.2 / 1.6	مميزة مشتركة مميزة مميزة مميزة مميزة
OPJ18	Sm1 Sm9 Sm1	2.4 1.9 1.0	/ / /	مميزة مميزة مميزة
OPM14	Sm1 Sm1,Sm6	2.5 2.43	/ /	مميزة مشتركة
OPN16	Sm1 Sm10 Sm9 Sm1	4.7 / 4.2 /	/ 4.4 / 2.3	مميزة مميزة مميزة مميزة
OPR17	Sm1,Sm10	2.5	/	مشتركة
OPT19	Sm9,Sm10 Sm1,Sm6	2.2 2.0	/ /	مشتركة مشتركة
OPV14	Sm9,Sm10 Sm1 Sm1,Sm6	2.5 1.8 1.15	/ / /	مشتركة مميزة مشتركة

ان هذا التغاير او التباين الواسع الذي تكشف عنه مؤشرات RAPD، مكن من تشخيص الانواع والسلالات المتقاربة جداً، والحصول على بصمة وراثية متخصصة لعزلة معينة بأستخدام بعض البادئات (26) وفي التشخيص على مستوى السلالة اوعلى مستوى تحت النوع (35). وان هذه النتائج تتفق مع ما تم الحصول عليه في هذه الدراسة، إذ يوضح جدول (5) ظهور حزم منفردة مميزة وبصمة دنا خاصة للعزلات قيد الدراسة.مثل الحزمة المنفردة التي اظهرها البادىء OPN16 في العزلة المتحملة للملوحة Sm10 التي يمكن عدها مؤشراً (Marker) لهذه العزلة كما موضح في جدول (5)، كذلك فأن العزلة ضعيفة التحمل للملوحة Sm1 ، كان لها عدد اكثر من الحزم المنفردة او المؤشرات مع بادئات مختلفة، وقد يكون احدها مؤشراً مرتبطاً بتحمل الملوحة مثلاً مع البادىء OPA10 وOPA12 وغيرها من البادئات، وتشير الكثير من الدراسات الى التغايرات بين عزلات الرايزوبيا إذ شخص Nogales وجماعته (24)، تسع طفرات محفزة بالجين القافز في *R. tropici* خاصة بخفض التحمل للملح، وتكون هذه الطفرات فاقدة لمواقع جينية ضرورية عدة لأكتساب التكيف لارتفاع مستوى الملح الخارجي. اما Boscari

وجماعته (10) فقد عمد الى نقل جينات من *S. meliloti*، المتحملة للملوحة الى بكتريا *B. japonicum* الحساسة جداً للملح، لأنها فاقدة لهذه المجموعة من الجينات مما زاد من تحمل هذه الاخيرة للملح مقارنة بالعزلة الابوية.

وشخص Payakapong وجماعته (27)، مجموعتين من الجينات الخاصة بتحمل الملوحة في *Sinorhizobium* sp. السلالة BL3 المتحملة للملح والمعزولة من نباتات نامية بشكل طبيعي في ظروف الشد الملحي. وكذلك عزل Miller–Williams وجماعته (21)، طفرات حساسة للملوحة من *S. meliloti* كانت فاقدة لعدد من الجينات الموجودة في هذا النوع ومنها الجين المسؤول عن انتاج EPSII المرتبط باللزوجة وغيره.

من خلال هذه الدراسات، تستنتج ان العزلة او السلالة عالية التحمل او ضعيفة التحمل للملوحة تكون متغايرة على مستوى المادة الوراثية، اي ان التغاير في DNA نتيجة مختلف انواع الطفرات اوحالات الاقتران مع بكتريا اخرى، او ان تكون الصفة موجودة أصلاً في بعض الانواع. ان هذا التغاير هو الذي يسبب اكتساب صفة التحمل او التحسس للملح، وهذا ماكشفته نتائج مؤشرات RAPD، التي كشفت عن وجود تباين وراثي واسع بين العزلات قيد الدراسة المتباينة في تحملها للملوحة.

المصادر

1- الحسني، خلود ابراهيم حسن (2002). استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في دراسة التنوع الوراثي في البطاطا. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم / جامعة بغداد.

2- الدركزلي، محمد عبد الجليل (2004). عزل وتشخيص بكتريا الرايزوبيا المتحملة للملوحة ودراسة تأثيرها في العلاقة التكافلية مع نبات الباقلاء (*Vicia faba*). رسالة ماجستير، كلية التربية ابن الهيثم– جامعة بغداد– العراق.

3- الربيعي، ابراهيم هادي (2002). دراسة وراثية كيموحيوية حول بكتريا *Sinorhizobium meliloti*. رسالة ماجستير، كلية التربية ابن الهيثم– جامعة بغداد–العراق.

4- العاصي، عقيل حسين علي (2002). استخدام مؤشرات الدنا في تحليل التنوع الوراثي للشعير (*Hordeum vulgare* L.) المزروع في العراق. اطروحة دكتوراه. كلية التربية ابن الهيثم– جامعة بغداد– العراق.

5- Ahmad, F. (1999). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals genetic relationships among the annual *Cicer* species. Theor. Appl. Genet., 98:657-663.

6- Alloing, G.; I. Travers; B. Sagot; D. LeRudulier and L. Dupont (2006). Prolin betaine uptake in *Sinorhizobium meliloti*: Characterization of Prb, an OPP- like ABC transporter regulated by both proline betaine and salinity stress. J. Bacteriol., 188 (17):6308-6317.

7- Barnett, M., R. Fisher; T. Jones; C. Komp; A. Abola; F. Barloy-Hubler and S. Long (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. PNAS, 10:1073-1085.

8- Beck, D.; L. Materon and F. Afandi (1993). Practical Rhizobium- legume technology manual. Technical Manual No. 19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria.

9- Bolaños, L., A. El-Hamdaoui and I. Bonilla (2003). Recovery of development and functionality of nodules and plant growth in salt-stressed *Pisum sativum-Rhizobium leguminosarum* symbiosis by boron and calcium.

10- Boscari, A.; K. Mandon; M.-Ch. Poggi and D. Le Rudulier (2004). Functional expression of Sinorhizobium meliloti Bets, High-Affinity betaine transport, in *Bradyrhizobium japonicaum* USDA110. Appl. Environ.Micobiol., 70(10): 5916-22.

11- Botestein, D.; R. White; M. Skolnick and R. Davis (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. Hum. Genet, 32: 314-31.
12- El-Hamdaoui, A.; M. Redondo-Nieto; R. Rivilla; I. Bonilla and L. Bolaños (2003). Effect of boron and calcium nutrition on the establishment of the *Rhizobium leguminosarum*- pea (Pisum *sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. Plant Cell and Environ, 26:1003-11.
13- Greenway, H. and P. Munns (1980). Mechanism of salt tolerance in non halophytes. Annu. Rev. Plant Physiol., 34:149-59.
14- Grudman, H.; C. Schneider; D. Hartung; F. Daschner and T. Pith (1995). Discriminatory power of three DNA typing techniques for P. aeruginosa. J. Clin. Microbiol, 3:528-32.
15- Gupta, R.J. and I.P. Abrol (1990). Salt- affected soils: their reclamation and management for crop production. Adv. Soil Sci., 5:223-228.
16- Jebara, M.; M.E. Aouani; R. Mhamdi and M. Mars (2000). Effect of salt on *Sinorhizobium* sp. Isolated from Tunisia either in vitro or in association with Medicago sp. Agriculture, 9(2):99-102.
17- Jenkins, M.B. (2003). Rhizobial and Bradyrhizobial symbionts of mesquite from the Sonoran desert: salt tolerance, facultative halophily and nitrate respiration. Soil Biol. Biochem, 35:1675-82.
18- Lloret, J.; B. Wulff; J. Rubio; J. Downie; I. Bonilla and R. Rivilla (1998). Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol, 64(3): 1024-8.
19- Maniatis, T.; E. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory. New York.
20- Mclnnes, A.; Thies, J.; Abbott, L. and Howieson, J.(2004). Structure and diversity among Rhizobial strains, populations and communities- a review. Soil Biol. Biochem., 36: 1295-1308.
21- Miller-williams, M.; P. Loewen and J. Oresnik (2006). Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. Microbiology, 152:2049-59. (abstract).
22- Moschetti, G.; A. Peluso; A. Protopapa; M. Anastasio; O. Pepe and R. Defez (2005). Use of nodulation pattern, stress tolerance, nod C gene amplification, RAPD-PCR and RFLP- 16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar Viciae. Syst. Appl. Microbiol., 28(7):619-31.
23- Mullis, K. B. and F. Faloona (1987). Spesific syntyhesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol, 155-335. (cited).
24- Nogales, J.; R. Campos; H. BenAbdelKalek; J. Olivares; C. Lluch and Sajuan (2002). Rhizobium tropici genes involved in free- living salt tolerance are equired for the establishment of efficient nitrogen- fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. Molecular plant- Microbe interaction, 15(3): 225-32.
25- Noli, E.; Silvio, and T. Roberto (1997). Comparative analysis of genetic relationships in barley based on RFLP and RAPD markers. Genome, 40: 607-16.
26- Oliveira, I.; M. Vasconcellos; L. Seldin; E. Paiva; M. Vargas and N. Sa (2000). Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. associated with beans cultivated in Brazilian Cerrado soils. Braz. J. Microbiol., 31(1):20-26.
27- Payakapong, W.; P. Tittabutr; N. Teaumroong; N. BoonKerd; P. Singlton and D. Borthakur (2006). Identification of two clusters of genes involved in salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. Strain Bl3.Symbiosis, 41: 47-53.

28- Pospiech, P. and S. Newman (1995). Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA. In: Kieser, T.(ed.). John Innes Center, Nerwich NRL\7uH, UK.

29- Raffetti, D.; C. Scotti; S. Ghocchi; S. Fancelli and M. Bazzicalupo (1996). Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. Appl. Environ. Microbiol, 62(7): 2279-85.

30- Ramos, M.; A. Gordon; F. Minchin; J. Sprent and R. Parsons (1999). Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Ann. Bot., 83: 57-63.

31- Roche (1999). Molecular Biochemicals Csompany.Taq DNA polymerase from *Thermus aquaticus* BM. Germany.

32- Sadowsky, M.; H. Keyser and B. Bohlool (1983). Biochemical characterization of fast and slow-growing Rhizobia that nodulate soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol., 33(4): 716-22.

33- Shamseldin, A. and D. Werner (2005). High salt and high pH tolerance of neww isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. Curr. Microbiol., 50(1): 11-16.

34- Soussi, M.; S. Santamaria; A. Ocana and C. Lluch (2001). Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in salt-tolerant strin of *Mesorhizobium ciceri*. J. Appl. Microtoiol., 90 (3): 476-82.

35- Stepkowski, T.; L. Moulin; A. Krzyianska; A. McInnes; I. Law and J. Howieson (2005). European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting Lupins and Serradella in soils of western Australia and South Africa, Appl., Environ. , Microbiol., 71 (11): 7041 – 52.

36- Steppler, H.A. (1987). ICRAF: Dexade of agroforestry development. In : Steppler, H.A. and Nair P.K. (eds), Agroforestry, adecade of development, 13-24. International council for Research on Agroforestry, Nairobi, Kenya.

37- Stowers, M. (1985).Carbon metabolism in *Rhizobium* species, Ann. Rev. Microbiol., 39: 89-108.

38- Thies, J.; E. Holmes and A. Vachot (2001). Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review, Aust. J. Exp. Agr., 41:299-319.

39- Trinchant, J.-C.; A. Boscari; G. Spennato; G. Vande Sype and D. LeRudulier (2004). Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress, exploring its compartmentalization in nodules, Plant Physiol., 135: 1583-94.

40- Vincent, J.M. (1970). A manual for the practicl study the root-nodule bacteria I.B.P hand book No. 15. Blackwell Scintific Publication Ltd., Oxford.

41- Williams, M. (1991). The polymerase chain Reaction (PCR), In: Workshop handbook "RFLP in plant Breeding", International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) New Delhi, February 4-22 , pp. 65-70 .

42- Williams, J.G.K.; A.R. Kubelik; K.J. Livak; J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1990). DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucl. Acids Rese., 18: 6531-35.

43- Young, J.P. and K.E. Haukka (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia, New Phytol., 133:87-94 .

44- Zahran, H.H. (1997). Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. Biol. Fertil, Sci., 25: 211-23.

45- Zahran, H.H. (1999). Rhizobium-Legumes symbiosis and nitrogen fixation under sevear conditions and in an arid climate. Microbiol. Molecul. Bid. Review, 63 (4):968-89.

46- Zahran, H.; L. Räsänen; M. Karsisto and K. Lindström (1994). Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS- PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. World J. Microbiol Biotechnol., 10:100-5.

47- Zhang, X.-X.; B. Kosier and U. Priefer (2001). Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. Viciae isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. Mol. Ecol., 10:2297-2305.

USE OF RANDOM AMPLIFIED OF POLYMORPHIC DNA (RAPD) MARKERS TO DETECT GENETIC POLYMORPHISM IN SOME RHIZOBIAL ISOLATES (*Sinorhizobium meliloti*) ISOLATED FROM IRAQI SOILS*

H.A.A. Mohammad N.N. Husain A.A. Taha

ABSTRACT

The present study included an isolation of ten local strains of *Sinorhizobium meliloti*, from root nodules of alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) The plants were collected from different agroclimatic locations of Baghdad and from other regions of Iraq. Four strains were obtained from different sources were also included in this study.

The salt tolerance of the all isolates to NaCl determined by using Mannitol Salt Yeast extract (MSY) solid medium supplemented with different concentrations of these salts, from 0.5% to 6% with intervals of 0.5 %. The results showed that three isolates (Sm8, Sm10, and Sm12) were tolerated up to 6% concentration of salt. One isolate (Sm1) can tolerate up to 1.5 %. The tolerance of remaining isolates varied between 1.5% and 6% concentrations of NaCl. Four isolates were selected for further studies, Sm10 (tolerated), Sm1 (sensitive), Sm6 and Sm9 (semi-tolerate).

Random Amplified of Polymorphic DNA (RAPD) markers were tested on the total isolated DNA from the studied isolates. By using 19 different primers, only five did not give any result with the isolated DNA. The remaining 14 primers produced 74 amplified bands. Three primers (OPA01, OPA15 and OPA16) produced 6 monomorphic bands. The 11 primers were able to produce 30 polymorphic bands, which can be used for genetic polymorphism investigations among the bacterial isolates, which diver in their ability for tolerating different levels of salts. The results revealed that OPJ18 primer had the highest efficiency in bands producing with 17.6%, while OPA15 had registered the lowest percentage efficiency (1.3%). The OPC16 primer had the highest discriminating power in polymorphic bands producing with 20%, while the OPR17 primer had the lowest discriminating power with 3.3%. The result also showed that all primers were able to produce a unique band for one or more of the studied isolates, except the primers OPR17 and OPT19 which showed common bands between two of the isolates without any unique bands producing.

Part of PhD. thesis of the first author

* State Board of Agric. Resear- Ministery of Agric- Baghdad, Iraq.
** Coll. of Education- Ibn Al- Haitham- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.
*** Center of Biotech.-AL nahrain Univ.- Baghdad, Iraq.