

Molecular diagnosis of rhizobia isolated from the root of some leguminous plants

Mohammed Abdelilah Al-Shakarchi^{1*}, Najwa Ibrahim Al-Barhawi², Khalid Daham Ahmed³

^{1,2,3} Department of Biology, Education College for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: ^{1*} dr.mohammedsh@uomosul.edu.iq, ² dr.najwa@uomosul.edu.iq, ³ khalid.d.a@gmail.com

(Received April 21, 2021; Accepted June 18, 2021; Available online August 28, 2021)

DOI: [10.33899/edusj.2021.168642](https://doi.org/10.33899/edusj.2021.168642), © 2021, 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

Rhizobia represents one of the most important types of beneficial soil bacteria, as it contributes to fixing atmospheric nitrogen. In the present study, twenty four isolates of rhizobial bacteria were isolated from root nodules of six leguminous plants. These are *Medicago sativa*, *Trigonella foenum-graecum*, *Cicer arietinum*, *Vicia faba*, *Lens culinaris* and *Lupinus spp.* which planted in four regions of Ninevah province (wire farm house in the Education College / Mosul University, Ba'shiqah town and Sadaa & Bauazh) for the agricultural season 2010-2011. These isolates were put in six groups depending on diagnostic tests and type of plant host (alfalfa, fenugreek, chickpeas, bean, lentils and lupine) from which the bacteria isolated from their root nodules. These groups are RhM, RhT, RhC, RhF, RhL and RhLu respectively.

RAPD – PCR technique with four random primers were used to draw the genetic Dendrogram in order to demonstrate the relationships among the species of rhizobial bacteria isolated from the root nodules of different host. The results revealed that there are genetic diversity among these species and also diversity still exist among the isolates of the same species but at low level. According to the results of diagnostic tests, RAPD – PCR technique and specificity of rhizobial bacteria to infect their hosts, we can relate the isolates in the suggested groups to their scientific names as follow: *Sinorhizobium meliloti* (RhM), *Sinorhizobium meliloti* (RhT), *Rhizobium leguminosarum* *bv. cecir* (RhC), *Rhizobium leguminosarum* *bv. vicia* (RhF), *Rhizobium leguminosarum* *bv. lentil* (RhL), *Rhizobium lupini* (RhLu).

Key word: Rhizobia, **RAPD-PDR**

التشخيص الجزيئي لبكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لبعض النباتات البقولية

^{1*} د. محمد عبدالاله الشكرجي ² د. نجوى ابراهيم البرهاوي ³ د. خالد دحام احمد

قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل

الخلاصة

تمثل بكتريا الرايزوبيا احد اهم أنواع بكتريا التربة المفيدة كونها تساهم في تثبيت النتروجين الجوي ففي الدراسة الحالية تم عزل اربعة وعشرون عزلة لبكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لسته من نباتات العائلة البقولية وهي *Trigonella* و *Medicago sativa* و *Lupinus spp.* و *Lens culinaris* و *Vicia faba* و *Cicer arietinum* و *foenum-graecum* التي زرعت في أربع مناطق من محافظة نينوى وهي (البيت السلبي في كلية التربية/جامعة الموصل ومزرعتان تابعتان لناحية بعشيقية ومزرعة في منطقة سادة وبعويزة) للموسم الزراعي 2010-2011 م. وصنفت عزلات بكتريا الرايزوبيا إلى ستة مجاميع بالاعتماد على الفحوصات التشخيصية ونوع العائل النباتي الذي عزلت منه (الجت والحلبة والحمص والبقلاء والعدس والترمس) وهذه المجاميع هي (RhM و RhT و RhC و RhF و RhLu و RhL) على التوالي. استخدمت تقانة تفاعلات مؤشرات التضاعف العشوائي Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD-PCR) باستخدام أربعة من البادئات العشوائية (RAPD) وأظهرت النتائج أن هناك تبايناً وراثياً ما بين الانواع البكتيرية المدروسة والمعزولة من مضائف مختلفة وأن هذا التباين لازال موجوداً بين عزلات بكتريا النوع الواحد والمعزولة من العقد الجذرية من النباتات البقولية المزروعة في مناطق مختلفة ولكن بمستوى أدنى.

واستناداً إلى نتائج الفحوصات التشخيصية وتقانة الـ (RAPD – PCR) وخصوصية اصابة البكتريا للعائل الخاص بها فقد سميت العزلات البكتيرية في المجاميع المذكورة اعلاه بتسمياتها العلمية: *Sinorhizobium meliloti* (RhM) و *Sinorhizobium meliloti* (RhM) و *Rhizobium leguminosarum bv. vicia* (RhF) و *Rhizobium leguminosarum bv. cecir* (RhC) و *Rhizobium leguminosarum bv. lentil* (RhL) و *Rhizobium lupini* (RhLu).

الكلمات المفتاحية: الرايزوبيا ، التفاعل التضاعف العشوائي

1. المقدمة

تعد العائلة البقولية Leguminaceae من اكبر العائلات النباتية فهي تضم عدد كبير من النباتات العشبية والشجيرات والاشجار إذ وضعت تحت رتبة Leguminale التي تنضوي تحتها عائلات ثلاثة هي: البقلية Caesalpiniaceae ، والسنطيات Mimosaceae، الفراشية Papilionaceae والمعروفة ايضا باسم Fabaceae [1]. تضم العائلة البقولية عددا كبيرا من محاصيل الخضر والمحاصيل الحقلية التي تنتشر زراعتها في جميع انحاء العالم والمعروفة باهميتها الاقتصادية والغذائية منها الجت *Medicago sativa* L. و البرسيم *Trifolium spp.* والحلبة *Trigonella foenum-graeum* والحمص *Cicer arietinum* L. و الباقلاء *Vicia faba* و العدس *Lens esculentus* و الترمس *Lupinus spp.*

افراد هذه العائلة تتميز عن بقية العوائل النباتية الاخرى بتكوين علاقة تكافلية مع البكتريا الـ *Rhizobium* المتواجدة في المحيط الجذري لها والمعروفة ببكتريا *Rhizobia* إذ ينتج من هذه العلاقة تكوين عقد جذرية وتثبيت النتروجين الجوي وتحويله إلى امونيا يمكن للنباتات الاستفادة منه [2]. تضم عائلة بكتريا *Rhizobiaceae* الأجناس التالية: *Rhizobium* و *Azorhizobium* و *Bradyrhizobium* و *Sinorhizobium* و *Mesorhizobium* و *Allorhizobium* وقسمت إلى مجموعتين الاولى بطيئة النمو

Fast Growing Rhizobium التي تتراوح مدة نموها بين سبعة أيام أو أكثر والثانية سريعة النمو Slow Growing Rhizobium التي تستغرق فترة نموها ثلاثة أيام [3].

وتهدف الدراسة الحالية لتشخيص ودراسة الاختلاف الوراثي ما بين عزلات بكتيريا الرايزوبيوم المعزولة من جذور النباتات البقولية المزروعة في بعض مناطق محافظة نينوى باستخدام تقنية مؤشرات التضاعف العشوائي (RAPD-PCR).

مواد وطرق البحث

1.2 عزل بكتيريا الرايزوبيوم من العقد الجذرية

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 سادة وبعويزة ومنطقة بعشيقه بالاضافة الى منطقة الرشيدية) ورمزت المناطق بالارقام (1,2,3,4) وبحسب المناطق التي اخذت منها العينات على التوالي، ولستة انواع من نباتات العائلة البقولية (الجت والعس والحلبة والباقله والحمص الترمس)، فصلت العقد المتكونة على جذور النباتات البقولية وغسلت بالماء المقطر. غمرت بعدها في الكحول الايثيلي تركيزه 70% لمدة ثلاث دقائق بعد ذلك تم غسلها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ثم نقلت الى محلول هايوكلوورايت الصوديوم NaOCl تركيزه (3:1 حجم/حجم) ماء/هايوكلوورايت الصوديوم وغمرت فيه لمدة 15 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم وبمعدل ثلاث مرات وبعد ذلك نقلت الى طبق بتري يحتوي على ورق ترشيع معقم لغرض تجفيف العقد من الماء العالق بها بعد ذلك نقلت العقد الى وسط خلاصة الخميرة والمانيتول الصلب (YEMA Yeast Extract Mannitol Agar) وحضنت عند درجة حرارة $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ ولمدة 24 الى 48 ساعة وذلك لغرض التأكد من كفاءة عملية التعقيم. سحقت العقد المعقمة باستخدام قضيب زجاجي معقم وفرشت بالتخطيط على اطباق بتري معقمة تحتوي على وسط YEMA وحضنت عند درجة حرارة $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ ولمدة 24 الى 48 ساعة. درست اشكال الخلايا البكتيرية ونوع المستعمرات باتباع الطرق المعتمدة [4] و[5]. كما اجري اختبار التخصص العائلي لكل عزلة حسب طريقة Singh وجماعته [6] وتم التأكد من مقدرة كل عزلة على تكوين العقد الجذرية على المضيف النباتي الخاص بها [7].

2.2 تشخيص بكتيريا الرايزوبيوم

أخذت عينات من المستعمرات النامية ودرست اشكالها واشكال خلاياها وصفاتها المظهرية باستخدام صبغة كرام Gram stain kit وفحصت بالعدسة الزيتية (100x) للمجهر الضوئي المركب [5].

3.2 الاختبارات البايوكيميائية لعزلات بكتيريا الرايزوبيوم

شملت الاختبارات البايوكيميائية على السلالات البكتيرية المعزولة من العقد الجذرية لعدد من النباتات البقولية قيد الدراسة، كل من اختبار تسييل الجيلاتين Gelatin liquefaction Test [7]، مقدرة الفلورة Fluorescence Test واختبار انتاجها لانزيم البيوريز Urease Test [8]، اختبار انتاجها لانزيم الكاتاليز Catalase Test واختبار فوكس - بروسكر Voges-Proskauer Test [9]، اختبار استهلاكها للسترات Citrate Utilization Test واختبار انتاج الاندول Indol Production Test [10]، الكشف عن مقدرة

البكتيريا على انتاج انزيم الاوكسيداز من خلال اختبار Cytochrome Oxidase Test [11]، اختبار الميثيل الاحمر Methyl Red Test [12]، فضلا عن اختبار قدرة البكتيريا على الحركة وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H₂S عن طريق تلقیح وسط SIM [13].

4.2 عزل وتنقية محتوى الـ DNA البلازميدي من عزلات بكتيريا الـ *Rhizobium* باستخدام المواد المجهزة من قبل شركة Promega:

تم عزل محتوى الـ DNA البلازميدي باستخدام عدة العمل الجاهزة المجهزة من قبل شركة Promega، اذ رسبت الخلايا البكتيرية للمزرعة البكتيرية السائلة بعمر 48 ساعة باستخدام انبوب طرد مركزي (ابندورف) بحجم 1.5 مل باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 13000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح بصورة كاملة. أضيف 100 µl من محلول (I) وعلق الراشب باستخدام جهاز المزج Vortex، ثم أضيف اليه 200 µl من محلول (II)، مزجت الانابيب عن طريق تقلبيها بهدوء عدة مرات. اضيف اليها 150 µl من محلول (III) ومزج بشكل مباشر عدة مرات كما موضح في الخطوة السابقة، اعيدت عملية الطرد المركزي المبرد لمدة 10 دقائق وبسرعة 13000 دورة/دقيقة. نقل 400 µl من الراشح 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. أجريت عملية الطرد المركزي وبسرعة قصوى 13000 دورة/دقيقة، لمدة 10 دقائق وبعدها تم التخلص من الراشح المتكون من الايثانول، وغسل الراشب باستخدام 200 µl من كحول الايثانول 70% ومزج بلطف ثم تم طردها مركزيا لمدة 5 دقائق للتخلص من الايثانول. بعد ذلك جففت الانابيب بوضعها بصورة مقلوبة على ورق ترشیح للتخلص من بقايا الايثانول، علق الراشب الذي يمثل البلازميدات باستخدام 50 µl من محلول TE وحفظ لحين الاستخدام.

5.2 عزل وتنقية الـ DNA الجينومي من عزلات بكتيريا الرايزوبيا:

تم عزل الـ DNA الجينومي من عزلات بكتيريا الرايزوبيا باستخدام Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promrga)، اذ لقع 5 مل من وسط YEM السائل بمستعمرة فنية من البكتيريا قيد الدراسة ثم حضن الوسط بدرجة حرارة 28 ± 1 °م ولمدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة وبسرعة 150 دورة /دقيقة. اخذ 1 مل من المزرعة البكتيرية النامية واجري عليها عملية الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة \ دقيقة ولمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة 4 °م. سكب الراشح وعلق الراشب البكتيري بحوالي 600 µl من محلول Nuclei lysis وبعد المزج حضن لمدة خمس دقائق بدرجة حرارة 80 °م ومن ثم برد إلى درجة حرارة المختبر. أضيف إليه 3 µl من محلول إنزيم RNase وبعد المزج حضن بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 15 إلى 60 دقيقة ثم برد المزيج إلى درجة حرارة المختبر.

أضيف 200 µl من محلول ترسيب البروتين (Protein precipitation solution) إلى المزيج وبعد تحريكه حضن بحمام ثلجي لمدة خمس دقائق أعقبه عملية النذب المركزي بسرعة 13000 دورة /دقيقة ولمدة 3 دقائق وبدرجة حرارة 4 °م. نقل الراشح إلى أنبوبة نظيفة ومعقمة حاوية على 600 µl من الكحول الايزوبروبانول وبعد المزج أجريت عملية النذب المركزي وبنفس الظروف السابقة. سكب الراشح وأضيف اليه 600 µl من 70% ايثانول وبدرجة حرارة المختبر وبعد التحريك أجريت عملية الطرد المركزي وبنفس الظروف أعلاه. جفف الراشب بمدة لا تقل عن 10 إلى 15 دقيقة وعلق الراشب بـ 100 µl من محلول Rehydration (Rehydration solution) وحفظ عند درجة حرارة 4 °م لحين الاستخدام.

6.2 تقدير تركيز الـDNA الجينومي وتعيين نقاوته طيفياً:

أخذ 20 مايكروليتر من نماذج الـDNA المحضرة وأكمل الحجم إلى 2 مل بالمحلول المنظم TE-buffer وقيست الكثافة الضوئية باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية عند الطول الموجي 260nm. تم حساب تركيز الـDNA الجينومي استناداً إلى [14].

7.2 ظروف تفاعل التضخيم لنماذج الـDNA الجينومي المحضرة:

استخدم الـDNA المحضر من العزلات قيد الدراسة لأجراء تفاعلات مؤشرات التضاعف العشوائي وباستخدام البوادئ (AlphaDNA) كما في الجدول (1):

الجدول (1) البادئات العشوائية المستخدمة في تفاعل RAPD-PCR

ت	البادئ	تسلسل القواعد النتروجينية (5'→3')
1	OPF-01	5'GGTGC GGGAA 3'
2	OPR-01	5'GTTTCGCTCC 3'
3	OPR-02	5'CGGCCCTGT 3'
4	OPR-03	5'AAGAGCCCGT 3'

أجريت التفاعلات باستخدام إثنا عشر انبويًا من الانابيب الحاوية على PCR PreMix (Bioneer) Kit مقسمة على ست مجاميع اعتماداً على مجاميع بكتريا الرايزوبيا المستخدمة. أضيف إلى كل انبوب 100 ng من الـDNA الجينومي المحضر من العزلات البكتيرية و 20 pmol من البادئ أما انبوب السيطرة فحاوي على نفس هذه المكونات ماعدا الـDNA. أكمل الحجم في كل تفاعل إلى 50 µl باستخدام الماء المقطر المعقم إذ وضعت الانابيب في جهاز المبلر الحراري Thermocycler (Techne TC3000) وتم برمجة الجهاز حسب طريقة [15]، واستخدم في البرنامج 35 دورة (مسخ الـDNA بدرجة حرارة 94 °م ولمدة دقيقة واحدة، ارتباط البادئات بقطعة DNA بدرجة حرارة 35 °م ولمدة دقيقة واحدة، الاستطالة بدرجة حرارة 72 °م ولمدة دقيقتين)، ثم رحلت العينات على هلام الاكاروز بتركيز 1.2% ولمدة ثلاث ساعات تحت فرق جهد 60 فولت وكشف عن نتائج التفاعلات باستخدام جهاز UV Transilluminator وأخذت الصور لهلام الاكاروز باستخدام الكاميرا الرقمية.

8.2 تحليل نتائج التضاعف العشوائي للـDNA (RAPD-PCR):

أخذت النتائج الظاهرة على هلام الاكاروز وكتبت بشكل جدول توصيفي لبيان العلاقة ما بين العزلات حيث يمثل الرقم (1) وجود الحزمة بينما الرقم (0) لعدم وجودها. عين المجموع الكلي للحزم مع حجمها والمتولدة من قبل كل بادئ ولكل عذلة ابتداء من الحزم ذات الأحجام الصغيرة والموجودة في أسفل الهلام وصولاً إلى الأعلى حيث الحزم الأكبر حجماً.

تم حساب قيمة كفاءة كل بادئ والقوة التمييزية له حيث يستفاد منها في تحديد التسلسلات المتممة للبادئ في المادة الوراثية لكل عزلة وذلك باستخدام صيغ رياضية معتمدة [16]، وجدت العلاقة الوراثية بين العزلات البكتيرية المنتخبة بتحويل بيانات التوصيف (Characterization data) إلى قيم المسافة (Distance) باستخدام الحاسوب ضمن برنامج Similarity for Qualitative Data (SIMQUL) الذي يعتمد على معادلة [15].

رسم المخطط الشجري Dendrogram الذي يوضح العلاقة الوراثية بين بكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية المدروسة والذي يعتمد قيم الأبعاد الوراثية التي تم الحصول عليها من الخطوة السابقة وذلك عن طريق استخدام البرنامج الإحصائي Un weighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) إذ تم إدخال هذه القيم عن طريق الحاسوب ضمن برنامج MVSP النسخة 3.22 واستخدم تحليل Jaccard's Coefficient في تحليل النتائج التي تم الحصول عليها من خلال استخدام البرنامج المذكور أعلاه.

9.2 الترحيل الكهربائي :

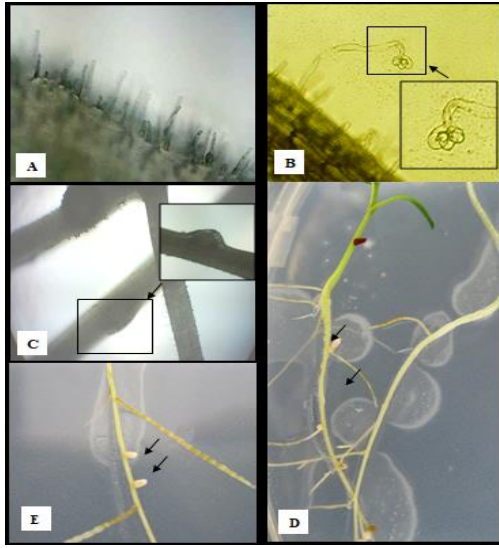
اعتمد طريقة Kado و Liu [17] في تحضير هلام الاكاروز وترحيله كهربائياً. حملت العينات باستخدام صبغة التحميل إلى 20µl من عينات DNA البلازميدي وعينة من λDNA المقطوعة بالإنزيم القاطع EcoRI كعلامة قياسية لتقدير حجم الحزم في هلام الاكاروز. حملت هذه العينات في حفر هلام الاكاروز استخدم فرق جهد 45 فولت لمدة 15 دقيقة بعد ذلك تم زيادة الفولتية إلى 70 فولت ولمدة ثلاث ساعات. صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide وبتركيز 1 µg/ml ولمدة 15 إلى 30 دقيقة ثم عرض للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي (254nm) في جهاز UV Transilluminator للكشف عن حزم الـ DNA البلازميدي في العينات قيد الاختبار.

3. النتائج والمناقشة:

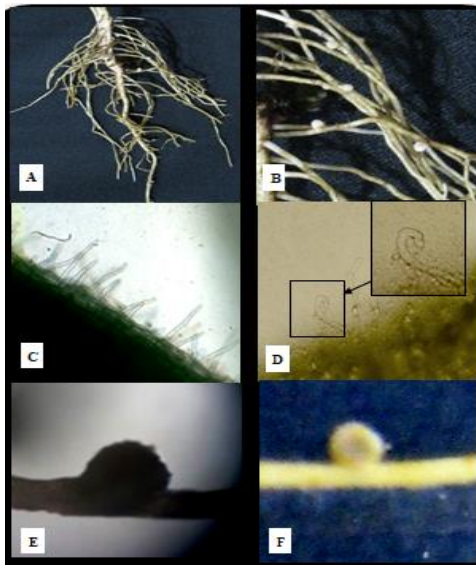
1.3 اختبار التخصص العائلي لبكتريا الرايزوبيا المعزولة:

لوحظ بدء تشوه الشعيرات الجذرية للنباتات البقولية بعد ثلاثة إلى خمسة ايام من التحضين مكونة اشكال ملتوية أو ملتفة تعرف (بعضا الراعي) ومن ثم تكوين العقد الاولى والناضجة بعد مرور 10 إلى 21 يوم من الاصابة.

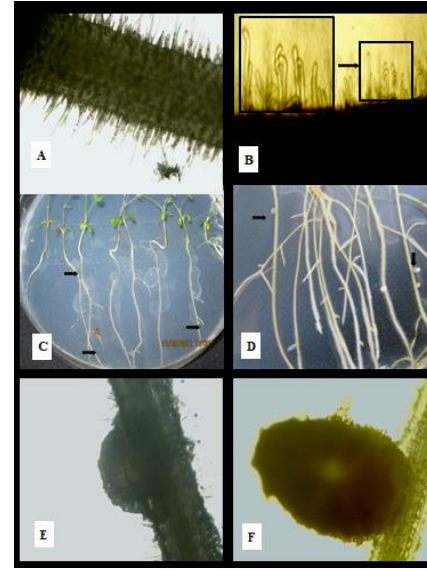
ظهرت في نباتي الجت والحلبة ذات شكل متطاوول إذ بلغ معدل عدد العقد 3 لكل نبات موزعة على المحور الرئيس والتفرعات الثانوية والملقحة ببكتريا RhM و RhT على التوالي. بينما كان معدل عدد العقد الناتجة 4 عقد ذات شكل منتظم (كروي) والمتكونة على جذور نباتات الحمص والبقلاء والعدس والملقحة ببكتريا الرايزوبيا RhC و RhF و RhL على التوالي، في حين تكونت ثلاث عقد جذرية ذات اشكال متطاولة على جذور نباتات الترمس والملقحة ببكتريا الرايزوبيا لمجموعة RhLu ، كما هو واضح قي الاشكال (1-5).



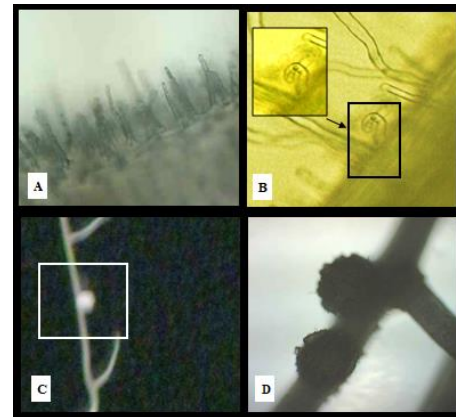
شكل (2) مراحل تكون العقد الجذرية في نبات الحلبه
 A: الشعيرات الجذرية غير المشوهة (100X).
 B: الشعيرات الجذرية المشوهة (100X).
 C: بادرات الحلبه بعمر اسبوع (40X).
 D: العقد الجذرية على الجذر الرئيس لنبات الحلبه.
 E: العقد الجذرية المتكونة على الجذر الرئيس لنبات الحلبه



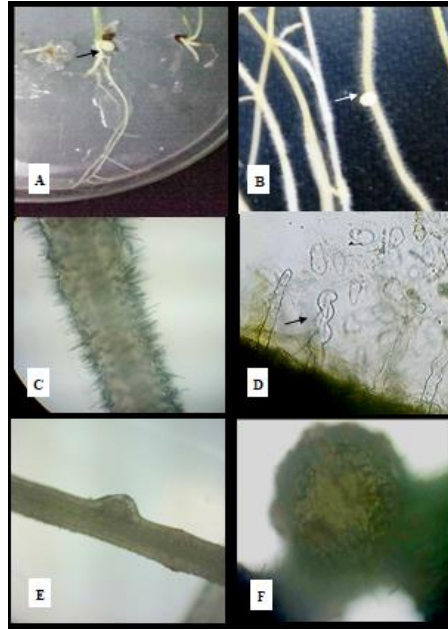
شكل (4) مراحل تكون العقد الجذرية في نبات الباقلاء
 A و B: جذر نبات الباقلاء وتظهر فيه العقد الجذرية.
 C: الشعيرات الجذرية غير المشوهة (100X).
 D: الشعيرات الجذرية المشوهة (100X).
 E: العقد الجذرية المتكونة على الجذر لنبات الباقلاء (40X).
 F: عقدة جذرية صغيرة الحجم (40X) (منظر جانبي).



شكل (1) مراحل تكون العقد الجذرية في نبات الجت
 A: الشعيرات الجذرية غير المشوهة (40X).
 B: الشعيرات الجذرية المشوهة (100X).
 C: بادرات الجت بعمر اسبوعين وتظهر فيها العقد الجذرية
 D: العقد الجذرية المتكونة على الجذر الرئيس لنبات.
 E: عقدة جذرية بعمر اسبوع (40X).
 F: عقدة جذرية ناضجة (40X).



شكل (3) مراحل تكون العقد الجذرية في نبات الحمص
 A: الشعيرات الجذرية غير المشوهة.
 B: الشعيرات الجذرية المشوهة (100X)
 C: العقد الجذرية المتكونة على الجذر الرئيس لنبات الحمص.
 D: صورة مكبرة للعقد الجذرية المتكونة على الجذر الرئيسي لنبات
 حمص (40X).



شكل (5) مراحل تكون العقد الجذرية في نبات العدس
 A و B: بادرات العدس بعمر اسبوعين وتظهر فيها العقد الجذرية
 C: الشعيرات الجذرية غير المشوهة (40X).
 D: الشعيرات الجذرية المشوهة (100X).
 E: بداية تكون العقد الجذرية المتكونة على الجذر لنبات العدس
 (40X) (منظر جانبي).
 F: عقدة جذرية ناضجة (40X) (منظر عمودي).

2.3 الصفات المورفولوجية والزراعية لبكتريا الرايزوبيا المعزولة:

أظهرت النتائج أن المستعمرات البكتيرية النامية لجميع العزلات على الاطباق الحاوية على وسط YEM الصلب كانت ذات الوان متباينة (ما بين العاجي والكريمي) ودائرية الشكل سطوحها مرتفعة وذات حافات ملساء ومخاطية القوام. كما بينت نتائج صبغ العزلات بصبغة كرام بأنها بكتريا سالبة وذات اشكال مجهرية. هذه الصفات التي تمت ملاحظتها لمجموعتي بكتريا الرايزوبيوم RhT و RhM تشابه تلك التي عزلت من العقد الجذرية لنبات الجت من قبل الباحثين [9]، أما مجاميع بكتريا الرايزوبيوم RhC و RhF و RhL و RhLu فظهرت اكثر لزوجة من المجموعتين السابقتين . هذه النتائج تتوافق مع تلك التي وجدها الباحثين [15] عند دراستهم لعشرة اصناف من بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من نبات العدس، وكذلك ما وجده Gauri وآخرون [18] عند مقارنة لحوالي 85 عزلة من بكتريا الرايزوبيا التي كونت عقدا جذرية على نباتات البرسيم مع العزلة القياسية (*Rhizobium trifolii* (MTCC905).

3.3 الاختبارات البايوكيميائية :Biochemical Tests

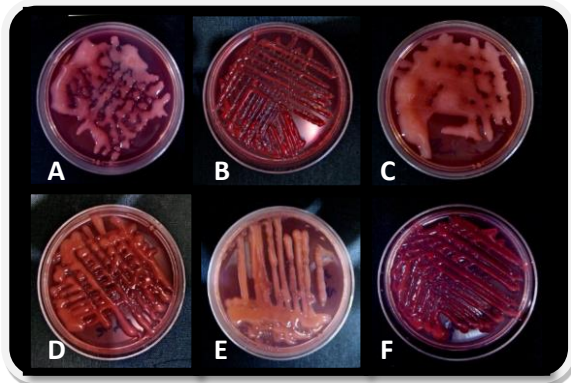
بينت نتائج الاختبارات البايوكيميائية لعزلات الرايزوبيا المعزولة انها امتازت ببعض الصفات المشتركة مع بعضها (الجدول3)، كقدرتها على الحركة كذلك تلون ورقة الترشيح المشبعة بمحلول كاشف الاوكسيديز باللون البنفسجي والدال على قدرة هذه البكتريا لإنتاج إنزيم الاوكسيديز. وقدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الكاتاليز من خلال تكوين فقاعات الغاز على شريحة الفحص، بينما ظهرت نتيجة سالبة فيما يخص اختبارات الاندول والفوكس بروسكر واستهلاك سترات الصوديوم وعدم قدرتها لى إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين وأنزيمي اليوريز والجيلاتينيز [19]، في حين كانت اختبارات إنتاج الحامض من السكريات المانوز والكلوكوز والسيليلوز موجبة من خلال تحليل السكريات وتحويل الوسط إلى الحامضي بدلالة تغير لون الوسط من الأصفر إلى الأخضر، أما بالنسبة لبقية السكريات الرانوز والمالتوز فقد كانت سالبة. هذه النتائج تتفق مع ما ذكره Shahzad وآخرون [20] عند دراستهم لخمسين عزلة من بكتريا *S. melliloti* التي عزلت من العقد الجذرية لنباتات الجت في خمسة مواقع من باكستان فيما عدا Rht1 كانت محلل لسكر الكلوكوز.

الجدول(2): الاختبارات البايوكيميائية لعزلات بكتريا الرايزوبيا المعزولة.

RhLu				RhL				RhF				RhC				RhT				RhM				الاختبارات
4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	4	3	2	1	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الحركة
Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Red	Red	Red	Red	Pink	Pink	Pink	Pink	Congo red
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	oxidase
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Catalase
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sodium citrate
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H ₂ S
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Urea hydrolysis
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Indol
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Voges proskauer
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gelatin
R	R	R	R	R	R	R	R	W	W	W	W	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2%
R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	4%
S	S	S	S	W	W	W	W	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	6%
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	W	W	W	W	W	W	W	W	8%
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	B	B	B	B	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Bromo thymol blue
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Acid from msaltose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Acid from mannose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Acid from Glucose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Acid from rhamnose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Acid from Cellulose
+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Fluoresce

كذلك يظهر من الجدول (2) تبايناً في لون المستعمرات عند زراعة بكتريا الرايزوبيا على وسط YEM الصلب الحاوي على 0.0025% من صبغة الـ Congo Red (CR) حيث ظهرت مستعمرات مجموعة RhM باللون الوردي الفاتح والمعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت في حين كان اللون احمرأً مميزاً لمجاميع RhLu و RhT والتي عزلت من العقد الجذرية لنباتات الحلبة والترمس على التوالي أما بقية مجاميع بكتريا الرايزوبيا ذات اللون البرتقالي والمتمثلة بالمجاميع RhC و RhF و RhL والمعزولة من العقد الجذرية لنباتات الحمص والبقلاء و العدس على الشكل (6).

إن ظهور المستعمرات بهذه الألوان يدل على قابلية هذه البكتيريا على التقاط هذه الصبغة من الوسط وبدرجات مختلفة، هذه الصبغة تلون amyloid و Cellulose وتتداخل مع D-glucan ومن المحتمل ان ترتبط هذه الصبغة مع السكريات المتعددة الموجودة في كبسولة هذه البكتيريا وهذه الدراسة تتفق مع دراسة لخمس وعشرون سلالة من بكتيريا *R. leguminosarum* حيث أظهرت مستعمراتها الألوان البرتقالي والوردي والأحمر الغامق والأبيض وأمكن اعتبار خاصية امتصاص الصبغة كعلامة للسلالة في تشخيص *R. leguminosarum*. هذا التباين بدأ مشابهاً في سلالات بكتيريا *R. trifoli* و *R. meliloti* التي نمت على اوساط YMA الحاوية على صبغة (CR) وبدرجة حرارة 24-28 °م [22,21].



الشكل (6) اختبار قابلية بكتيريا الرايزوبيا والمغزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية قيد الدراسة على التقاط صبغة Congo red حيث أن (A) مجموعة بكتيريا RhM و (B) مجموعة بكتيريا RhT و (C) مجموعة بكتيريا RhC و (D) مجموعة بكتيريا RhF و (E) مجموعة بكتيريا RhL و (F) مجموعة بكتيريا RhLu.

كذلك أظهرت النتائج أن هذه المجاميع تتحمل تحملاً متبايناً لتراكيز من كلوريد الصوديوم (NaCl)، إذ أظهرت العزلات في المجاميع البكتيرية RhM و RhT والمغزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت والحلبة على التوالي نمواً جيداً عند زراعتها على وسط YEM الحاوي على التراكيز 2 و 4 و 6% من كلوريد الصوديوم في حين فشلت في النمو عند تركيز 8% منه. أما البكتيريا المغزولة من العقد الجذرية لنباتات الحمص والباقلان ضمن المجموعتين RhC و RhF على التوالي فقد تفاوتت في نموها إذ كان جيداً للبكتيريا ضمن المجموعة RhC عند التركيز 2% بينما كانت البكتيريا ضمن المجموعة RhF ضعيفة النمو عند نفس التركيز وفشلت كلا المجموعتين في تحملها للتراكيز 4 و 6 و 8% من كلوريد الصوديوم. أما مجموعة بكتيريا RhL و RhLu والمغزولتين من العقد الجذرية لنباتات العدس والتمرس على التوالي فقد أظهرت كلاهما نمواً جيداً عند التركيزين 2 و 4% وفشلت بكتيريا المجموعة الأولى من النمو عند التركيز 6% بينما كان النمو للمجموعة الثانية ضعيفاً عند التركيز 6% بينما لم تظهر كلا المجموعتين أي تحمل لكلوريد الصوديوم عند التركيز 8%. وقد يعزى سبب ذلك عندما تصادف البكتيريا بيئة مختلفة مثل ارتفاع درجة الحرارة ووجود المعادن الثقيلة والاملاح ومستوى محدد من التغذية عندئذ تبدأ البكتيريا ببرنامج التعبير الجيني كاستجابة للجهد الازموزي بواسطة تركيز عالي من الاملاح والذي يظهر مجموعة من البروتينات تنتج بكميات متزايدة استجابة إلى هذا الجهد، كما وتعد صفة المقاومة للملوحة من الصفات التشخيص المهمة وقد تختلف صفة التحمل لأملاح كلوريد الصوديوم باختلاف المناطق المغزولة منها البكتيريا [19,20].

في بكتريا *R. etli* EBRI26 فان البروتينات المذابة والمعزولة منها والتي فصلت بواسطة الترحيل الكهربائي للهلام وتم ملاحظتها بعد صبغ الهلام بصبغة كومزي تبين ان هناك تعبيراً لسته من البروتينات على الاقل باوزان جزيئية مختلفة قد تم ملاحظتها بعد تعرض البكتريا إلى 4% من كلوريد الصوديوم مقارنة بنفس السلالة والمنمأة في وسط خالي من الاملاح. في تجربة اخرى فان البروتينات المذابة في المزارع البكتيرية المحفزة وغير المحفزة بالاملاح للسلالة *R. etli* EBRI26 قد تم تاشيرها منفصلةً بصبغات السيانو التالقية قبل عملية الترحيل الكهربائي وقد لوحظ أن هناك 49 بروتيناً قد تم التعبير عنها بصورة مميزة بعد اضافة كلوريد الصوديوم وان 14 بروتيناً منها كان بمستوى عالي من التعبير و 35 منها بتعبير واطئ [23].

إن مجاميع بكتريا الرايزوبيا RhM و RhT و RhC و RhL و RhLu والمعزولة من العقد الجذرية للنباتات قيد الدراسة على وسط YEM الصلب والحاوي على 0.0025 % من صبغة Bromothymol blue تبين انها غيرت لون الوسط من اللون الازرق إلى الاصفر وذلك بسبب تغييرها لقيمة الاس الهيدروجيني إلى الحامضي باستثناء بكتريا من مجموعة RhF التي عزلت من العقد الجذرية لنباتات الباقلاء فإن الوسط بقي محتفظاً باللون الازرق. عند زراعة بكتريا الرايزوبيوم المعزولة على وسط King media فانها اظهرت تبايناً في تفلورها إذ لوحظ التفلور لكل من البكتريا المعزولة من نباتات الجت والحلبة عند فحصها بجهاز UV light Transilluminator بينما كانت بكتريا المعزولة من عقد نباتات الحمص والبقلاء والعدس والترمس عديمة التفلور. وتتفق النتائج التي تم الحصول عليها عند دراسة عشرين عزلة بكتيرية معزولة من العقد الجذرية لنباتات الفول من منطقة şanlıurfa التركية اذ تمكنوا من تصنيفها إلى ثلاث مجاميع على اساس تحملها لتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم، تمكنت المجموعة الاولى من النمو على الاوساط الغذائية الحاوية على 2 و 3 و 4 % من كلوريد الصوديوم بينما المجموعة الثانية لم تنمو على التركيز 4% منه في حين كانت المجموعة الاخيرة ضعيفة النمو اذ استطاعت النمو على التركيزين 1 و 2% من كلوريد الصوديوم [24].

4.3 تقانة التفاعل التضاعفي متعدد الاشكال لسلسلة الـ DNA (RAPD – PCR):

تم قياس قيم تراكيز الـ DNA ونقاوته الجدول (3) المحضرة من كل عزلة باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية عند الطول الموجي (260, 280) nm في إجراء تفاعلات RAPD-PCR [15].

الجدول (3) تراكيز ونقاوة الـ DNA المنقاة من عزلات بكتريا الرايزوبيا والمستخدمه في تفاعل RAPD – PCR.

ت	العزلة البكتيرية	التركيز (µg/ml)	النقاوة
1	M1	0.169	1.657
2	M2	0.170	1.712
3	T1	0.261	1.612
4	T2	0.254	1.625
5	C1	0.138	1.715
6	C2	0.140	1.604
7	F1	0.210	1.620
8	F2	0.190	1.548
9	L1	0.167	1.524
10	L2	0.241	1.584
11	Lu1	0.295	1.658
12	Lu2	0.275	1.724

5.3 البادئات المستخدمة في تفاعلات الـ RAPD-PCR:

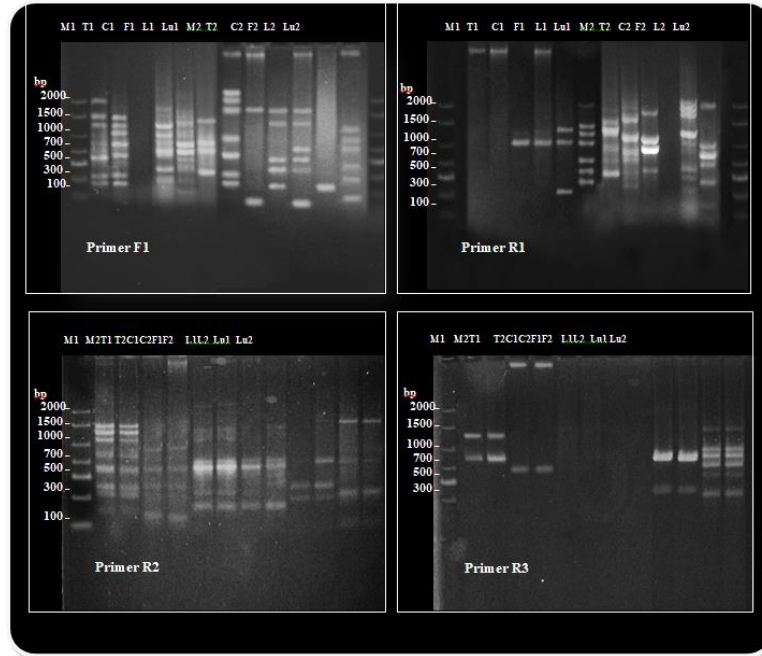
استخدم البادئ F1 والحاوي على عشر قواعد نتروجينية ذاتالتسلسل '5'GGTGC GGGAA3' وتحت ظروف التفاعل أظهرت النتائج ظهور 23 مجموعة من حزم الـ DNA المتباينة في الحجم والمتولدة من التفاعل والتي توزعت على 12 عذلة من بكتريا الرايزوبيا وتراوحت احجامها ما بين (100 إلى 2000) زوج (الجدول 7). بلغ اعلى عدد من حزم الـ DNA المتولدة من التفاعل ، تسع حزم لنبات العدس، بينما لم يتم الحصول على حزم من الـ DNA لبكتريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص وربما يعود السبب إلى عدم وجود تسلسلات من القواعد النتروجينية في الـ DNA الجينومي والتي يمكن ان يرتبط بها مع البادئ F1، بلغت كفاءة البادئ المستخدم 30.62 بينما كانت القوة التمييزية لهذا البادئ 31.08 (الجدول 4).

الجدول (4) أعداد حزم الـ DNA الكلية والمتباينة المتولدة من استخدام البوادئ F1 و R1 و R2 و R3 في تفاعلات RAPD-PCR وكذلك الكفاءة والقوة التمييزية لكل منها.

ت	اسم البادئ	تسلسل القواعد النتروجينية لهم	عدد الحزم	عدد الحزم المتباينة	كفاءة البادئ	قوة التمييز للبادئ
1	OPF-01	5'GGTGC GGGAA3'	65	19	30.10	32.20
2	OPR-01	5'GTTTCGCTCC3'	48	18	22.86	30.50
3	OPR-02	5'CGGCCCTGT3'	73	16	34.76	27.12
4	OPR-03	5'AAGAGCCCGT3'	24	6	11.43	10.17
العدد الكلي			210	59		

التحليل الاحصائي

تم تحويل نتائج الهجرة الكهربائية في هلام الاكاروز (الشكل 7) بتركيز 1.2% لنواتج تفاعلات التضاعف العشوائي الـ DNA الجينومي المنقاة من بكتريا الرايزوبيا إلى جدول توصيفي لحزم الـ DNA الجينومي حيث وجدت علاقة معدلات المسافة الوراثية عن طريق تكوين مصفوفة Distance matrix باستخدام تحليل Average Distance (الجدول 6).



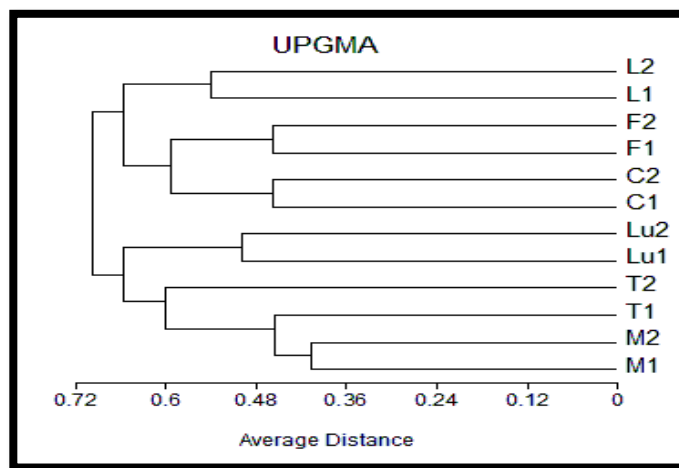
الشكل (7) الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز (1.2%) لنواتج تفاعلات التضاعف العشوائي للـDNA الجينومي المنقى من بكتريا الرايزوبيوم المعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية: الجت (الاعدة M1 و M2) و الحلبة (T1 و T2) و الحمص (C1 و C2) و الباقلاء (F1 و F2) و العدس (L1 و L2) و الترمس (Lu1 و Lu2) باستخدام البادئات F1 و R1 و R2 و R3.

يتبين من المصفوفة اعلاه أن اطول مسافة وراثية هي 0.791 والتي تفصل ما بين انواع من بكتيريا الرايزوبيا والمعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت والباقلاء وكذلك الحلبة والتمرس والحمص والمزروعة في ناحية بعشيقية والحلبة والعدس في منطقتي الدراسة. بينما كانت اقصر مسافة وراثية ما بين الانواع البكتيرية هي 0.408 وتشمل تلك المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت والحلبة والمزروعة في البيت السلبي و الجت في منطقتي الدراسة. اما بقية المسافات الوراثية فكانت ما بين قيم المسافات المذكورة اعلاه. من الملاحظ فان الانواع من بكتيريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنفس المضيف تتفصل عن بعضها البعض بمسافات أقصر من تلك المسافات بين الانواع البكتيرية المعزولة من العقد الجذرية لمضيف مختلفة، ومن الملاحظ ايضاً ان هناك تبايناً وراثياً ما بين العزلات البكتيرية ضمن النوع الواحد والمعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية المزروعة في مناطق مختلفة.

الجدول (6) قيم مصفوفة المسافات الوراثية ما بين أنواع بكتريا الرايزوبيوم والمعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية كما استخرجت من مؤشرات تفاعلات التضاعف العشوائي لها.

Average Distance Distance matrix	UPGMA											
	Primer R1						Primer R2					
	M1	M2	T1	T2	C1	C2	F1	F2	L1	L2	Lu1	Lu2
M1	0.000											
M2	0.408	0.000										
T1	0.408	0.500	0.000									
T2	0.577	0.577	0.645	0.000								
C1	0.707	0.645	0.707	0.645	0.000							
C2	0.736	0.677	0.736	0.612	0.456	0.000						
F1	0.645	0.764	0.707	0.645	0.577	0.540	0.000					
F2	0.736	0.791	0.736	0.612	0.677	0.577	0.456	0.000				
L1	0.707	0.707	0.707	0.645	0.764	0.612	0.577	0.540	0.000			
L2	0.736	0.677	0.791	0.677	0.677	0.707	0.736	0.645	0.540	0.000		
Lu1	0.612	0.540	0.612	0.736	0.677	0.577	0.736	0.707	0.612	0.645	0.000	
Lu2	0.612	0.677	0.677	0.791	0.791	0.764	0.736	0.764	0.677	0.707	0.500	0.000

أشار الباحث Sajjad في امكانية استخدام تفاعلات مؤشرات التضاعف العشوائي RAPD – PCR وثلاثون بادناً عشوائياً لتحليل نتائج التباين الوراثي ما بين إثنا عشر سلالة من بكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنبات العدس والمزروعة في عدة مناطق تابعة لأقليم البنجاب في باكستان. اوضحت النتائج ان هناك تبايناً وراثياً ما بين هذه السلالات وانها تقع ضمن مجموعتين متميزتين A و B مما يدل على أن التباين الوراثي يمكن ان يوجد ما بين سلالات النوع الواحد وهذا يتفق مع النتائج التي تم الحصول عليها. استخدمت المسافات الوراثية ما بين عزلات النوع الواحد والانواع المختلفة لرسم مخطط الشجري Dendrogram وفق طريقة UPGMA cluster analysis (الشكل 8) حيث تم ادخال قيم مصفوفة المسافات الوراثية في الحاسوب الالي ضمن برنامج MVSP النسخة 3.22 [15].



الشكل (8) مخطط الشجري لأثنى عشر عزلة تعود لستة انواع من بكتريا الرايزوبيا وذلك باستخدام تفاعلات مؤشرات التضاعف العشوائي.

من مخطط التحليل التجميحي يمكن استخراج النتائج التالية والتي تتضمن وجود احد عشر عقدة تنضوي فيها عزلات من بكتريا الرايزوبيا مختلفة الاعداد وتملك قيم متباينة من الاختلاف الوراثي. يمكن وضع هذه العزلات البكتيرية قيد الدراسة ضمن مجموعتين الاولى تضم بكتريا الرايزوبيا المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت والحلبة والترمس والثانية تنضوي فيها تلك المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الحمص والبقلاء والعدس (الجدول 5).

الجدول (5) عدد العقد والمجاميع البكتيرية التي تضمها وقيم الاختلاف الوراثي لها.

العقدة	المجموعة الاولى	المجموعة الثانية	قيم الاختلاف الوراثي	عدد العزلات البكتيرية في العقدة
1	M1	M2	0.408	2
2	العقدة 1	T1	0.454	3
3	C1	C2	0.456	2
4	F1	F2	0.456	2
5	Lu1	Lu2	0.500	2
6	L1	L2	0.540	2
7	العقدة 3	العقدة 4	0.593	4
8	العقدة 2	T2	0.600	4
9	العقدة 8	العقدة 5	0.657	6
10	العقدة 7	العقدة 6	0.657	6
11	العقدة 9	العقدة 10	0.698	12

4 . المصادر:

- 1- Y. M. Al-Katib. "Classification of seed plants". University of Baghdad. Dar Alwatania of Printing and Publishing, Baghdad. (1988).
- 2- C. Franche; K. Lindstrom and C. Elmerich "Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants". Plant and Soil, 321:35-59. (2009).
- 3- Microbionet. Bacteriology; Rhizobiaceae. Sciencenet Multimedia Publishing house Limited, Victoria, Australia. (2005).
- 4- P.H. Graham. "Selective Medium for Growth of *Rhizobium*", Applied Microbiol. p.769-770. (1969).
- 5- J. M. A. Vincent . "Manual for the Pracial Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook" No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.113-131. (1970).
- 6- B. Singh; R. Kaur and K. Singh. "Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenum graecum(fenugreek)*". Afr. J. Biotech.,7(20):3671-3676. (2008).
- 7- J. A. Morello; P. A. Granato and, H. E. Mizer. Laboratory manual and work book in Microbiology , 7th ed, Sprial Bound, Comb, P. 111-139. (2003).
- 8- E. O. King; M. K. Ward and D. E Raney. Two simple media for the demonstration of Pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med., 44:301-307. (1954).



- 9- J. G. Cappuccino and N. Sherman “Microbiology a laboratory Manual”. 5th ed, Addison Wesley Longman, Inc.,p.133-145. (1999).
- 10- E. J. Baron; M. T. Pezlo and L. M. Delamaza “Color Atlas of Diagnostic Microbiology”. Mosby-Year Book, United States of America,p.25-92. (1997).
- 11- C. W. Strattan and Y. W. Tang. Advanced techniques in diagnostic microbiology, Springer Science and Business Media, USA, P.94-117. (2006).
- 12- H. J. Benson “Microbiological” 8th ed, McGraw Hill Companies, Inc.,p.130-155. (2002).
- 13- R. M. Atlas; A. E. Brown and L. C. Parks “Laboratory Manual of Experimental Microbiology”. Mosby-Year Book,Inc., St-Louis, U.S.A. (1995)
- 14- D. Freifelder, Molecular Biology. 2th ed., Jones and Barlett Publishers, Inc., U. S. A. (1987).
- 15- M. Sajjad; T. A. Malik; M. Arshad; Z. A. Zahir; F. Yusuf and S. Rahman “PCR studies on genetic diversity of rhizobial strains” Int. J. Agri. Biol., 10:505-510. (2008).
- 16- H. Grundman; C. Scheidre; D. Hartung; F. D. Daschner and T. L. Pitt “Discriminatory Power of three DNA Based typing techniques for *P. aeruginosa*” J. Clin. Microbiol. 33: 528-534. (1995).
- 17- C. I. Kado and S. T. Liu “Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids” Bact. J. (3) 145 p. 1365-1373 (1981).
- 18- Gauri, S., A. K. Bhatt, R. P. Pant, S. Bedi, M. K. and Naglot, A. (2011). Journal of Agricultural Technology. Vol. 7(6): 1705-1723.
- 19- A. K. Deka and P. Azad “Isolation of Rhizobium strains; cultural and Biochemical characteristic”. Legume Res., 29: 209-212. (2006).
- 20- F. Shahzad; M. Shafee; F. Abbas; S. Babar; M. M. Tariq and Z. Ahmad “Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium meliloti* from root nodules of alfalfa (*medico sativa*)”. The J. of Animal & Plant Sciences, 22(2): 522-524.(2012).
- 21- M. Hussain; M. Ashraf; M. Saleem and F. Y. Hafeez “Isolation and Characterization of Rhizobial Strains From Alfalfa”. Pak. J. Agri. Sci., 39:32-34. (2002).
- 22- G. Singh, A. K. Bhatt, R. P. Pant, S.; M. K. Bedi and A. Naglot “Journal of Agricultural Technology”. Vol. 7(6): 1705-1723. (2011).
- 23- S. M. Wood and W. Newcomb “Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (*Medicago sativa*) root hairs by *Rhizobium meliloti*”. Can. J. Bot., 67: 3108-3122. (1989).
- 24- C. Cevheri; Kūçk, Ç. and Çetin, Fungicide, E. “Antibiotic, Heavy Metal Resistance and Salt Tolerance of Root Nodule Isolates from *Vicia palaestina*” .Afr. J. Biotech. 13:2423-2429. (2011).