الجمهورية العربية السورية
جـامـــعـــة دمـــشـــق
كـــلـيـــة الهندسة الـزراعية
قـســـم وقـــايـــة الـنـبـات

التوصيف والبصمة الوراثية لعزلات محلية من بكتريـــا العقد الجذرية (Rhizobia) وتقييم كفاءتها في تثبيط بعض الفطور الممرضة للبقوليات

أطروحة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية (تخصص وقاية النبات–أمراض نبات)

إعـــداد

م. منال سعد الدّوس

إشراف

المشرف
الدكتور محمود أبو غرّة
أستاذ في قسم وقاية النبات
كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق

المشرف المشارك
الدكتور محمد فوّاز العظمة
أستاذ في قسم وقاية النبات
كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق

2024

تصريح

أصرح بأن هذا البحث " **التوصيف والصمة الوراثية لعزلات لعزلات محلية من بكتريـــا العقد الجذرية (Rhizobia) وتقييم كفاءتها في تثبيط بعض الفطور الممرضة للبقوليات**" لم يسبق أن قُدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وأن كل العمل، والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرف والمشرف المشارك، وجميع المراجع التي ذُكرت في هذه الرسالة نُسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

المُرَشّحة

منال سعد الدّوس

DECLERATION

This is to declare that, this work" **Characterization and genetic fingerprinting of local isolates of root -knot bacteria (Rhizobia) and evaluation of their efficiency in inhibiting some pathogenic fungi of legumes** " is a new research work, and has neither been already accepted for any degree, no has been submitted concurrently for any other degree. All the mentioned results are my own efforts and done by direct supervision of my guides, all the referred literature are cited, and well-documented in the list of reference.

Candidate

Manal Al-Dous

شـــــــــــــــــــهادة

نشهد بأنّ العمل الموصوف في هذه الأطروحة، نتيجة بحث علمي قامت به المرشّحة منال سعد الدّوس تحت إشراف الدكتور محمود أبو غرة (أستاذ في قسم وقاية النبات- كلية الزراعة - جامعة دمشق)، والدكتور محمد فواز العظمة (أستاذ في قسم وقاية النبات- كلية الزراعة- جامعة دمشق)، وأنّ المراجع المستخدمة في هذه الأطروحة موثّقة في النص وقائمة المراجع.

المرشّحة	المشرف	المشرف المشارك
منال سعد الدّوس	محمود أبو غرة	محمد فواز العظمة

Certificate

We hereby certify that the work described in this thesis is the result of scientific research, performed by the researcher Manal Saad AL-Dous, under the supervision of Dr. Mahmoud abu Ghorrah and Dr. Mohammad Fawaz Azmeh (Department of Plant Protection- Faculty of Agriculture, Damascus University). All reference books resorted to by the researcher has checked by the text and references list.

Candidate	*supervisor*	*Co- supervisor*
Manal AL-Dous	*Mahmoud abu Ghorrah*	*Mohammad Fawaz Azmeh*

قرار لجنة الحكم

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية/ اختصاص وقاية النبات من كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق، وأُجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the degree of PhD in plant protection at the faculty of agriculture, Damascus university, Referee committee has approved the thesis.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2024/8/13.

أمام لجنة الحكم

أ.د. هدى قواص

أستاذ في قسم وقاية النبات/ كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق (عضواً)

أ.د. وليد نفاع

أستاذ في قسم وقاية النبات/ كلية الهندسة الزراعية الثانية- جامعة دمشق (عضواً)

أ.د.محمود أبو غرة

أستاذ في قسم وقاية النبات/ كلية الهندسة الزراعية-جامعة دمشق (عضواً مشرفاً)

أ.د. أحمد محمد مهنا

أستاذ في قسم وقاية النبات/ كلية الهندسة الزراعية-جامعة دمشق (عضواً)

د. أكرم البلخي

أستاذ مساعد في قسم علوم التربة/ كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق (عضواً)

شكر

بداية أحمد الله عز وجل وأشكره على توفيقه لي وإعانته لي في إتمام عملي هذا ووصولي إلى هذه المرحلة التي طالما انتظرتها، وكل الشكر والتقدير للذين قدموا لي يد العون والمساعدة للوصول إلى الغاية المرجوة من هذا العمل.

أتقدم بالشكر الجزيل والامتنان للدكتور **محمود أبو غرة** و**الدكتور محمد فوار العظمة** لتفضلهما في الإشراف على هذا البحث ولرعايتهما الصادقة وتقديمهما الجهد والنصح والتشجيع المستمر للوصول إلى نهاية هذا العمل.

أشكر الأساتذة أعضاء لجنة الحكم لما قدموه من توجيهات علمية قيمة أغنت البحث لوصوله إلى شكله المرجو.

كما أتقدم بخالص شكري وتقديري لإدارة الهيئة العامة للتقانة الحيوية وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور **نزار عيسى** مدير عام الهيئة العامة للتقانة الحيوية لما قدمه من تسهيلات لإنجاز هذا البحث، والدكتور **نورس الأبرص** رئيس **قسم التنوع الحيوي** لما قدمه لي من نصح ولدعمه المستمر وإرشاداته القيمة خلال فترة تنفيذ العمل.

ولا يفوتني أن أتوجه بعميق تقديري وامتناني للإخوة الأعزاء والأصدقاء الأوفياء: **د. اسماعيل الصالح، م. ريم خليف، م. شادي حمزة، م. بثينة السلامة** الذين لم يبخلوا بوقتهم وجهدهم لمساعدتي في إنجاز العمل الحقلي والمخبري فالشكر الجزيل لهم.

إهداء

إلى الأصل العتيق الذي لن ينضب عطاءه . . . والدي الغالي

إلى قديستي ودعواتها الصادقة . . . . . والدتي الغالية

إلى ألوان الفرح في حياتي . . . . . إخوتي و أخواتي

إلى رفيق دربي وسندي في السراء والضراء . . . . . زوجي م . أحمد الشبيب

إلى فراشاتي الملونة . . . . ابنتي نرد وابنتي توليب

. . . . إلى تراب الوطن ودماء الشهداء . . . .

. . . إليكم أهدي أطروحتي ونجاحي . . .

فهرس المحتويات

المحتوى	رقم الصفحة
الفصل الأول: الجزء التمهيدي (الإطار العام)	1
1-1- التعريفات Definitions	2
1-2- المقدمة Introduction	3
1-3- مشكلة البحث Research problem	5
1-4- تساؤلات البحث Research questions	6
1-5- فرضيات البحث Research Hypothesis	6
1-6- مسلمات البحث Research axioms	7
1-7- أهداف البحث Research Objectives	7
1-8- أهمية البحث Research importance	8
1-9- مسوغات البحث Research justifications	8
1-10-محدوديات البحث Research Limitations	8
الفصل الثاني: الدراسة المرجعية Literature Review	10
2-1- البكتيريا الجذرية	11
2-2- بكتريا العقد الجذرية (الرايزوبيا)	12
2-1-3- التعايش وتبادل الإشارات وتكوين العقد	13
2-1-4- المدى العوائلي	16

2-1-5- أهمية بكتريا الرايزوبيا المثبتة للآزوت	19
أ- تثبيت الآزوت	19
ب- إفراز الأحماض العضوية والأنزيمات	20
ت- إنتاج الهرمونات النباتية	20
ث- إنتاج حاملات الحديد Siderophore	21
ج- زيادة مقاومة النبات للمسببات المرضية	21
2-2- مرض ذبول فوزاريوم	23
2-3- المكافحة الحيوية لفطر ذبول فوزاريوم باستخدام الرايزوبيا	24
2-5- التباين الوراثي في بكتريا الريزوبيا وتقانة البصمة الوراثية rep-PCR DNA Fingerprinting technique	26
2-5- اللقاح الرايزوبي	28
الفصل الثالث: مواد وطرائق البحث Materials and Methods	31
3-1- جمع العينات النباتية	32
3-2- عزل البكتريا	34
3-3- تعريف البكتريا بالطرائق الكيميائية الحيوية	34
3-3-1- اختبار غرام بطريقة RYV GRAM reaction	34
3-3-2- اختبار الكاتالاز Catalase Test	34
3-3-3- اختبار الأوكسيداز Oxidase Test	34
3-3-4- اختبار تحلّل الجيلاتين Gelatin hydrolysis	35
3-3-5- اختبار تحلّل النشاء Starch hydrolysis	35

3-3-6- اختبار أحمر الميتيل Methyl red Test (MR)	35
3-3-7- اختبار التنفس ,Oxidation -Fermentation Test	35
3-3-8- اختبار استقلاب السكريات (غلوكوز- لاكتوز- مالتوز ببتون آغار)	35
3-4- العدوى الاصطناعية وتقييم كفاءة العزلات في تشكيل العقد	36
3-5- الاختبارات الجزيئية باستخدام تقانة Colony-Polymerase chaine reaction (Colony-PCR)	36
3-6- العدوى التصالبية	37
3-7- البصمة الوراثية	38
3-7-1- استخلاص الدنا DNA من العزلات البكتيرية	39
3-7-2- تفاعل البصمة الوراثية Repetitive element palindromic (rep-PCR)	39
3-8- اختبار قدرة البكتيريا المعزولة على تثبيط نمو مسبب ذبول فوزاريوم على الحمص	41
3-8-1- العزلات الفطرية	41
3-8-2- العزلات البكتيرية	41
3-8-3- اختبار قدرة العزلات البكتيرية على تثبيط نمو الفطر الممرض مخبرياً باستخدام طريقة القطاعات	42
3-8-4-اختبار قدرة العزلات البكتيرية على الحد من الإصابة بذبول فوزاريوم وتحسين نمو النبات باستخدام العدوى الاصطناعية ضمن الأصص	43
3-9- أمثلة شروط إنتاج السماد الحيوي	45
3-9-1- العزلة البكتيرية	45
3-9-2- المواد الحاملة	45
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة Results and Discussion	48

4-1- عزل البكتريا وتعريفها	49
4-1-1- تعريف البكتريا باستخدام الطرائق الكيميائية الحيوية	51
4-1-2- العدوى الاصطناعية وتقييم كفاءة العزلات في تشكيل العقد	55
4-1-3- التعريف باستخدام تقانة Colony-pcr	56
4-2- العدوى التصالبية	57
4-3- التباين الوراثي لعزلات الرايزوبيا	58
4-3-1- تحليل البصمة الوراثية rep-PCR ورسم شجرة القرابة الوراثية	63
4-4- اختبار قدرة البكتيريا المعزولة على تثبيط نمو فطر ذبول فوزاريوم على الوسط المغذي والحد من أعراضه ضمن الأصص	69
4-5- أمثلة شروط انتاج السماد الحيوي	76
الاستنتاجات والتوصيات Conclusion and Recommendation	79
الاستنتاجات Conclusion	80
التوصيات Recommendation	81
المراجع	82

فهرس الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
(1)	الأجناس الأكثر شهرة التابعة لمجموعة الرايزوبيا	13
(2)	بعض العوائل البقولية المزروعة والبرية لبكتريا الرايزوبيا.	18
(3)	تتابع النكليوتيدات في البادئ المستخدم للكشف عن مورثة nodA عند بكتريا الرايزوبيا.	36
(4)	مراحل تفاعل الـ PCR باستخدام البادئ nodA.	37
(5)	العزلات البكتيرية المستخدمة في اختبار البصمة الوراثية وعوائلها النباتية ومناطق جمعها.	38
(6)	تتابع النكليوتيدات في بادئات البصمة الوراثية (Rep–, ERIC–, BOX–) PCR.	40
(7)	التضاد بين العزلة البكتيرية (61) والعزلتين الفطريتين (F63، F51) ضمن الأصص.	43
(8)	التوزع الجغرافي للعزلات البكتيرية والعائل النباتي.	50
(9)	الخصائص الكيميائية الحيوية للعزلات البكتيرية.	53
(10)	مصفوفة التشابه والتباعد لعزلات Rhizobia من الأجناس *Rhizobium* و *Mesorhizobium* و *Ensifer* و *Bradyrhizobium*.	68
(11)	تأثير العزلات البكتيرية على العزلتين الفطريتين F63 و F51.	72
(12)	تأثير المعاملة بالعزلة البكتيرية 61 في تثبيط الفطر *F. oxysporum* f sp. *ciceris* وفي مؤشرات نمو نبات الحمص.	75

(13)	تغير تركيز اللقاح البكتيري مع مرور الزمن عند درجة حرارة 4 °س.	77
(14)	تغير تركيز اللقاح البكتيري مع مرور الزمن عند درجة حرارة 25 °س.	77

فهرس الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
(1)	التفاعل بين النبات وبكتريا الريزوبيا، ودور مورثات *nod* و *nif* في عملية التعقد والتثبيت الحيوي للآزوت	16
(2)	المسار الحيوي لاختزال الأزوت وتكوين الأمونيا بواسطة الأحياء الدقيقة المثبتة للآزوت الجوي.	20
(3)	العينات النباتية من المحاصيل البقولية المزروعة والبرية المجموعة	33
(4)	المستعمرات البكتيرية لبكتريا Rhizobia و Rhizobacteria على وسط Yeast Mannitol Agar(YMA)	49
(5)	الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلات البكتيرية	55
(6)	الرحلان الكهربائي لنواتج PCR على هلامة الأغاروز1% باستخدام زوج البادئات nodA.	56
(A.7)	حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحلان الكهربائي على هلامة Agarose 1.5 % لنواتج تفاعل تقانات BOX-PCR لعزلات محلية من Rhizobia ومقارنتها مع عزلات نموذجية تابعة للجنس Mesorhizobium (راجع المواد والطرائق)	60
(B.7)	حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحلان الكهربائي على هلامة	61

	لنواتج تفاعل تقانة ERIC–PCR % Agarose 1.5 لعزلات محلية من Rhizobia ومقارنتها مع عزلات نموذجية تابعة للجنس Mesorhizobium (راجع المواد والطرائق).	
(C .7)	حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحـــلان الكهربـائي على هلامة لنواتج تفاعل تقانة REP–PCR % Agarose 1.5 لعزلات محلية من Rhizobia ومقارنتها مع عزلات نموذجية تابعة للجنس Mesorhizobium (راجع المواد والطرائق).	62
(8)	شجرة القرابة الوراثية لعزلات Rhizobia المدروسة والمرجعية الناتجة عن البصمة الوراثية rep–PCR	67
(9)	أمثلة عن بعض العزلات البكتيرية (118، 119 ، 108، 56) التي أثرت على إحدى العزلات الفطرية دون الأخرى (F51، F63) بعد 7 أيام من التلقيح.	73
(10)	التضاد ضمن الأطباق بين العزلتين الفطريتين F51، F63 وبعض العزلات البكتيرية المعزولة من جذور البقوليات والتابعة لمجموعتي Rhizobia، و Rhizobacteria.	73
(11)	تأثير المعاملة بالعزلة البكتيرية الريزوبية 61 في الحد من أعراض الفطر *F. oxysporum* f sp. *ciceris* على نباتات الحمص ضمن الأصص، بالمقارنة مع الشاهد السليم.	75

الاختصارات Abberviations

الرمز –الاختصار	المصطلح العربي	المصطلح الانكليزي–اللاتيني
R	عزلة بكتيرية من مجموعة الريزوبيا	Rhizobia
PGPR	البكتريا الجذرية المعززة لنمو النبات	Plant growth promoting rhizobacteria
YMA	وسط مستخلص الخميرة والمانيتول	yeast mannitol agar
YM	وسط مستخلص الخميرة والمانيتول السائل	yeast mannitol
PDA	وسط آغار البطاطا والدكستروز	Potato dextrose agar
F63	عزلة شرسة من فطر فوزاريوم	*Fusarium oxysporum* f *sp. ciceris*
F51	عزلة شرسة لفطر فوزاريوم	*Fusarium oxysporum* f *sp. ciceris*
R61	عزلة بكتيرية تنتمي للريزوبيا–جنس *Mesorhizobium*	*Mesorhizobium*
R134	عزلة بكتيرية تنتمي للريزوبيا–جنس *Rhizobium*	*Rhizobium*
R133	عزلة بكتيرية تنتمي لمجموعة البكتريا الجذرية	Rhizobacteria

الملخص

نُفذ البحث في كلية الزراعة–جامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيويـة بين عـــامي 2018–2024. هَدَفَ البحث إلى عزل بكتريا الريزوبيا من جذور بعض البقوليات، وتعريف العزلات وكشف القرابة الوراثية بينها باستخدام تقنية rep–PCR DNA fingerprinting technique، واختبار القدرة التضادية لتلك العزلات تجاه الفطر المعزول محلياً المسبب للذبول الوعائي في الحمص *Fusarium oxysporum* f sp. *Ciceris*، كما هدف إلى أمثلة بعض الشروط لإنتاج سماد حيوي محلي باستخدام عزلة ريزوبية متفوقة. جُمعت عينات النباتات البقولية (فول، حمص، بازلاء، حندقوق، فصة، نفل/برسيم، فول الصويا، الحلبة، بيقية، عدس) من عدة محافظات (ريف دمشق، حمص، درعا، السويداء، اللاذقية، حماة، الرقة)، وعُزلت البكتريا من العقد الجذرية لهذه النباتات على وسط آغار الخميرة والمانيتول Yeast mannitol agar (YMA). نتج عن العزل 109 عزلات بكتيرية، انتمت 42 منها إلى مجموعة ريزوبيا، و19 عزلة لبكتريا Rhizobacteria اعتماداً على نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية والجزيئية والعدوى الاصطناعية، وقسمت العزلات الريزوبية تبعاً لنتائج العدوى التصالبية إلى أربعة أجناس: *Mesorhizobium* المتعايش مع نبات الحمص، و *Rhizobium* مع الفول والبازلاء، و *Bradyrhizobium* مع فول الصويا، و *Ensifer* مع الفصة والحندقوق.

أظهرت نتائج البصمة الوراثية أن تقانة REP–PCR أعطت أعلى تعددية شكلية بين العزلات البكتيرية، وبلغت نسبة التشابه بين العزلات المدروســة والعزلات المرجعية بين 38% و83%، و توزّعت العزلات البكتيرية للريزوبيا ضمن شجرة القرابة الوراثية إلى أربع مجموعات، ارتبط توزع اثنتين منها بالمنطقة الجغرافية؛ المجموعة الأولى ضمت العزلات المرجعية و9 أنماط وراثية للجنس *Mesorhizobium* من محافظة السويداء، والمجموعة الرابعة ضمت نمطَين للجنس *Bradyrhizobium* من الرقة، بالمقابل ضمت المجموعة الثانية 4 أنماط وراثية للجنس *Sinorhizobium*/*Ensifer* المتعايش مع نباتات الحلبة والحندقوق والفصة من محافظتي ريف دمشق وحمص، بينما ضمت المجموعة الثالثة 4 أنماط

وراثية للجنس *Rhizobium* من ريف دمشق وحمص والسويداء. بينت نتائج التضاد المخبري بين العزلات البكتيرية التي انتمت لمجموعتي Rhizobia و Rhizobacteria، وعزلتين فطريتين لذبول فوزاريوم الحمص المعرفة محلياً (F51 و F63)، أن 31 عزلة بكتيرية ثبطت النمو الفطري، منها 13 عزلة من مجموعة الريزوبيا و18 عزلة من البكتريا الجذرية (Rhizobacteria)، وتفوقت العزلتان 134(*Rhizobium*) و61 (*Mesorhizobium*) على بقية العزلات في تثبيط الفطر بنسبة تثبيط بلغت 68.89% و53.70% على التوالي. عند اختبار العزلة 61 على نباتات الحمص ضمن الأصص، أظهرت النتائج أن التلقيح ببكتريا ريزوبيا زاد تحمل النبات للمرض الفطري حيث أدى إلى انخفاض في شدة المرض ونسبة الإصابة. كما أظهرت نتائج أمثلة بعض شروط إنتاج السماد الحيوي باستخدام العزلة 134، تفوّق درجة الحرارة 4°س في حفظ حيوية البكتريا وبلغت مدة الحفظ 4 أشهر بينما بلغت 3أشهر عند درجة حرارة 25°س، ومن ناحية أخرى، فقد كانت التربة المنخولة أفضل المواد الحاملة للبكتيريا تلاها البيرلايت ثم التورب، وقد بلغ تركيز البكتيريا أعلى قيمة له في الشهر الثاني من التلقيح على اختلاف المواد الحاملة ودرجات الحرارة المختبرة في التجربة.

الكلمات المفتاحية: رايزوبيا، الاختبارات الحيوية الكيميائية، النباتات البقولية، سوريا، تقانة rep–PCR، فوزاريوم، الحمص، التضاد، سماد حيوي، مادة حاملة.

الفصل الأول

الجزء التمهيدي

(الإطار العام)

1-1-التعريفات Definitions

بكتريا العقد الجذرية Rhizobia: هي بكتيريا سالبة غرام، من قاطنات التربة، وتعمل على تثبيت الآزوت داخل العقد الجذرية التي تحفز تشكيلها النباتات البقولية. وجميعها متكافلة اختيارياً (Noel, 2009).

البكتريا الجذرية Rhizobacteria: هي بكتيريا مرتبطة بالجذور يمكن أن يكون لها تأثير ضار أو محايد أو مفيد للنبات، وعادة يشير هذا المصطلح إلى البكتريا التي تشكل علاقة تكافلية مع أنواع عديدة من العوائل النباتية، كما يشار إلى البعض منها باسم Plant Growth Promorting Rhizobacteria (PGPR) البكتريا المعززة لنمو النبات (Vessy, 2003; Kloepper,2003). تعمل هذه البكتيريا بشكل مباشر أو غير مباشر على تعزيز نمو النبات من خلال مجموعة متنوعة من الآليات، بما في ذلك زيادة كمية العناصر الغذائية المعدنية المتاحة للنبات، وتنظيم مستويات الهرمونات النباتية، وتثبيط مسببات الأمراض النباتية، (Khoso *et al.*, 2024).

ذبول فوزاريوم Fusarium wilt: هو أحد الأمراض الفطرية يحدث نتيجة وجود ونشاط الفطر الممرض فوزاريوم في أنسجة الأوعية الخشبية للنبات، يصيب بشكل أساسي الخضار الحولية ونباتات الأزهار والمحاصيل المزروعة وبعض الأشجار، وهو من قاطنات التربة، ويصيب النبات عن طريق الجذور التي يخترقها مباشرة أو عن طريق الجروح، وبعد اختراق الفطر جذر النبات، فإن الميسيليوم يصل إلى أوعية الخشب، وينتج ثلاثة أشكال من الأبواغ اللاجنسية وهي الأبواغ الكونيدية الصغرى والأبواغ الكونيدية الكبرى والأبواغ الكلاميدية، يتناسب مع الظروف البيئية الدافئة (Agrios,2005)

المكافحة الحيوية Biological control: هي استخدام الكائنات الدقيقة النافعة لمكافحة الكائنات الوبائية (بما في ذلك مسببات الأمراض والآفات والأعشاب الضارة) بشكل مباشر أو غير مباشر (Stenberg *et al.*, 2021).

التسميد الحيوي Biofertilizer: عملية تعتمد على استخدام الكائنات الحية الدقيقة لتحسين مستويات العناصر الغذائية في المحيط الجذري، وتنشيط النبات وحمايته من العوامل الممرضة (Carvajal-Muñoz and Carmona-Garcia, 2012)

التضاد الحيوي Antibiosis: تفاعل بين كائنين ينتج أحدهما مضادات حيوية أو مستقلبات ثانوية بتركيز منخفض ليؤثر سلباً على الكائن الحي الآخر، فيحد من نموه أو يقتله، بينما لا يتأثر الكائن المضاد بهذه المواد (Nehra *et al.*, 2021; Jaggi *et al.*, 2023).

مورثات nod: مجموعة من المورثات تتميز بها بكتريا الريزوبيا ينتج عنها خلال التفاعل المبكر بين البكتريا والنبات مايسمى بعوامل التعقد Nod factors فتنشأ بين كلا الطرفين استجابات تكافلية (تعايشية). تسمى بعض هذه المورثات بالعامة (nod A,B,C) والتي توجد عند جميع أجناس وأنواع الريزوبيا, وبعضها الآخر متخصص بكل نوع بكتيري وتلعب دوراً في تحديد العائل النباتي (Wulandari *et al.*, 2022).

مورثات nif: مورثات مسؤولة عن ترميز أنزيمات نتروجيناز وأنزيم أوكسيدريدوكتاز المسؤولة عن تثبيت الآزوت (Shamseldin, 2013).

1-2-المقدمة Introduction

تعد بكتريا التربة عنصر هاماً في الدورات الحيوية الكيميائية، وإن التفاعل بين البكتريا والنبات في المحيط الجذري هو الذي يحدد مدى صحة النبات وخصوبة التربة، وهذه التفاعلات معقدة ومترابطة لا تعتمد فقط على طرفـــــي التفاعل ولكن أيضـــاً على العوامل الحيوية واللاحيوية في المحيط الجــذري (Kumar and Saraf, 2015).

ترتبط بعض الأجناس البكتيرية بالجذور وتسمى البكتريا الجذرية Rhizobacteria، وهي من أهم المجموعات المستخدمة في التسميد الحيوي، وتضم مجموعتين رئيسيتين: Rizospheric التي تستعمر ســـــطح الجذر، و Endophytic التي تتوضع بين الخلايا النباتية لجذر النبات المضيف (Salwan *et al.*, 2023).

تعد بكتريا الريزوبيا أحد أهم تلك المجموعات التي تتركز بين خلايا الجذر، وهي بكتريا سالبة غرام من قاطنات التربة، تبدأ علاقتها التعايشية مع النبات البقولي بانجذابها للفلافونيدات التي يفرزها الجذر، والتصاقها بالخلايا الجذرية لهذا النبات. تدخل الجذر وتتجه إلى مركز الخلية الجذرية لتحرض الخلايا النباتية على الانقسام العشوائي فتتشكل العقد. بعدها تقوم الريزوبيا بالتثبيت الحيوي للآزوت، بتحويل الآزوت الجوي الجزيئي (N2) إلى الأمونيا والنترات لدعم عملية التمثيل الغذائي في النبات، وفي المقابل تتلقى الريزوبيا من النبات مركبات عضوية غنية بالكربون (Checcucci *et al.*, 2019).

تعزز الريزوبيا من نمو النبات وتزيد من قدرته على مقاومة الأمراض بشكل مباشر أو غير مباشر من خلال تثبيت الآزوت وإنتاج الهرمونات النباتية وحاملات الحديد وسيانيد الهيدروجين وإذابة الفوسفات وتحريض المقاومة الجهازية المحرضة وإنتاج المضادات الحيوية والأنزيمات المضادة للأكسدة وأنزيمات تحلل الجدر الخلوية (Mir *et al.*, 2021; Nagpal *et al.*, 2021).

تُعد المحاصيل البقولية من أهم وأقدم المحاصيل التي زرعها الإنسان واعتمد عليها في غذائه نظراً لارتفاع قيمتها الغذائية، حيث تعد مصدراً للبروتين النباتي ذو التكلفة الرخيصة وكبديل للبروتين الحيواني خاصة في الدول النامية ، إلى جانب استخدام نواتج هذه المحاصيل في صناعة الأعلاف اللازمة لتنمية الثروة الحيوانية والداجنة والسمكية (صقر وآخرون، 2021، عطية، 2017). تعاني المحاصيل البقولية في مراحل نموها كافة من العديد من الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية والنيماتودا، التي تصيب أجزاء النبات المختلفة مما يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة ولعل أهم هذه الأمراض وأكثرها انتشاراً هي الفطرية (Nene *et al.*, 2012)، حيث تصاب البقوليات بالذبول الفوزاريومي، فتظهر أعراضه على هيئة اصفرار وذبول وجفاف

الأوراق وتساقطها، ويظهر التلون البني على الأوعية في الساق والجذر(Meena and Nain, 2022; Mahmoud, 2016). تصعب مكافحة فوزاريوم بسبب نموه داخل النبات، واستمرارية وجود أبواغه وانتقالها في التربة. لذلك يوجد العديد من استراتيجيات المكافحة كالمكافحة الحيوية باستخدام الكائنات الدقيقة المضادة كالريزوبيا، حيث تم استخدام الريزوبيا بشكل فعال لمكافحة مرض ذبول فوزاريوم على البقوليات (Bobade *et al.*, 2022; El-Sersawy *et al.*, 2021). ونتيجة ازدياد الوعي والرغبة بالحصول على غذاء خالٍ من الأثر المتبقي للمبيدات وتأثيرها على الصحة، ظهرت أهمية استخدام الريزوبيا أو منتجاتها كأسمدة حيوية تعزز من نمو النبات وتزيد من إنتاجه، وتساهم في مكافحة الأمراض (Nagpal *et al.*, 2021). كما لابد من الإشارة إلى أن أهم مرحلة في إنتاج الأسمدة الحيوية في الدول التي تستخدم الأساليب النظيفة في الإنتاج الزراعي هي إجراء توصيف وقرابة وراثية للعزلات الريزوبية المعزولة حديثاً للتأكد من قرابتها للعزلات المتكيفة محلياً والمنتخبة سابقاً والتي أثبتت فعاليتها كأسمدة حيوية (Ondieki *et al.*, 2017; Menna *et al.*, 2009).

1-3-مشكلة البحث Research problem

أدى انتشار استخدام المبيدات والأسمدة الكيميائية للتأثير على تنوع مجتمع الأحياء الدقيقة في التربة والمحيط الجذري، وظهور سلالات مقاومة من الأمراض والآفات الحشرية الزراعية، عدا عن قدرة بعض الممرضات على كسر صفة المقاومة عند النبات، وظهور أمراض وآفات جديدة لم تكن تعتبر ذات أهمية اقتصادية سابقاً، مما جعل التخلي عن تلك المواد صعباً على الرغم من أضرارها، لذلك لابد من اللجوء إلى حلول محلية تعتمد على عزل وتعريف الأحياء الدقيقة النافعة كالريزوبيا من الترب المحلية والعقد الجذرية لكي تكون متأقلمة مع الظروف، وتكون أكثر قدرة على المنافسة مع العوامل الممرضة على استعمار الجذور وحمايتها والاستفادة من الموارد المتواجدة في التربة بشكل أسرع من العامل الممرض، وتكون هي خطوة أولى

من عدة خطوات تالية للتقليل من استخدام المواد الكيميائية ومن ثم الاستغناء عنها في الإنتاج الزراعي، وحفظ التربة الزراعية وإغناءها وحماية البيئة، وتحقيق الاستدامة الزراعية.

1-4-تساؤلات البحث Research questions

1. ما هي أجناس بكتيريا العقد الجذرية المتعايشة والمعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية المختلفة؟
2. هل يوجد قرابة وراثية بين أجناس الريزوبيا وهل ترتبط هذه القرابة بالتوزع الجغرافي؟
3. هل جميع العزلات البكتيرية المعزولة من العقد الجذرية قادرة على تثبيط نمو مشيجة فطر فوزاريوم في الزجاج *in vitro*؟
4. هل يوجد ارتباط بين قدرة الريزوبيا على تثبيط نمو مشيجة فطر الذبول في الزجاج *in vitro* وقدرتها على الحد من إصابة النبات بذبول فوزاريوم في الأصص، وتحسين مؤشرات النمو في النبات؟
5. ماهي أفضل مادة حاملة للقاح الرايزوبي من حيث فترة الحفظ بهدف تحضير السماد الحيوي؟
6. هل لاختلاف درجة الحرارة تأثير على مدة حفظ السماد الحيوي؟

1-5-فرضيات البحث Research Hypothesis

1. يختلف جنس أو نوع الريزوبيا باختلاف النبات البقولي المعزولة من عقده الجذرية.
2. يوجد تأثير تثبيطي للبكتيريا المعزولة من العقد للنباتات البقولية في نمو مسبب ذبول فوزاريوم على الحمص في الزجاج.
3. تقلل البكتيريا المعزولة من العقد للنباتات البقولية من نسبة الإصابة وشدة المرض على نباتات الحمص والفول المعداة بفطر ذبول فوزاريوم في الأصص.
4. تحسن البكتيريا المعزولة من العقد للنباتات البقولية من مؤشرات نمو النباتات البقولية المعداة بفطر ذبول فوزاريوم في الأصص.

5. يوجد علاقة ارتباط بين قدرة البكتيريا على تثبيط نمو مشيجة فطر الذبول في الزجاج *in vitro* وقدرتها على الحد من الإصابة بذبول فوزاريوم في الأصص.
6. يمكن تحديد القرابة الوراثية بين العزلات الرايزوبية باستخدام تقانة rep-PCR.

1-6-مسلمات البحث Research axioms

1. تعريف البكتيريا يعتمد على الطرائق الكيميائية الحيوية والجزيئية والعدوى الاصطناعية والتصالبية.
2. يعتبر الشق الجزيئي في تعريف البكتيريا مهم جداً في وقتنا الحالي لتأكيد وإثبات التعريف الذي كان قائما على الطرق التقليدية ويعد أكثر الاختبارات دقة.
3. مسببات الأمراض الفطرية وخاصة ذبول فوزاريوم هي من أخطر الأمراض التي تصيب البقوليات، وتؤدي إلى خسائر كبيرة في المحصول.
4. البكتيريا المعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية أثبتت قدرتها في تثبيط الإصابة بذبول فوزاريوم في المخبر والحقل.

1-7-أهداف البحث Research Objectives

1- عزل بكتريا الريزوبيا من جذور بعض البقوليات المجموعة من عدة مناطق سورية.

2- تعريف البكتريا المعزولة بواسطة الاختبارات الكيميائية الحيوية والجزيئية المعتمدة على الكشف عن مورثة nodA العامة.

3- دراسة التباين الوراثي بين العزلات باستخدام تقانات rep-pcr.

4- تقييم قدرة العزلات البكتيرية على تشكيل العقد الآزوتية.

5- تقييم قدرة بعض العزلات على الحد من تطور بعض الفطور الممرضة للبقوليات مخبرياً وضمن الأصص.

6- أمثلة شروط الاكثار الكمي لعزلات منتخبة من الريزوبيا.

1-8-أهمية البحث Research importance

أ- تعود أهمية هذا البحث إلى أهمية بكتريا الريزوبيا في حماية النبات من الممرضات النباتية، أو تقليل أعراضها بدون أن تسبب أي أثر متبقي أو سمية للإنسان والحيوان والبيئة، وبالتالي توفير بدائل طبيعية ومستدامة عن مواد الإنتاج الكيميائية.

ب- كما يسهم هذا البحث في دراسة كيفية السيطرة أو الحد من ذبول فوزاريوم خاصة أن هذا المرض منتشر في معظم الترب المحلية السورية.

ت- من الممكن أن تسهم مخرجات هذا البحث في تعزيز نمو وإنتاجية النباتات البقولية وغيرها لتحقيق الأمن الغذائي، بالوصول إلى تركيبة مناسبة للسماد الحيوي القائم على بكتريا الريزوبيا، وتقليل استخدام المبيدات والمواد الكيميائية التي تشكل عبئاً مادياً على المزارع نظراً لغلاء أسعارها واختلاف هذه الأسعار تبعاً للسوق الدولية.

1-9-مسوغات البحث Research justifications

1. تعد البقوليات من أهم المحاصيل على المستوى العالمي والمحلي نظراً لأهميتها الاقتصادية والغذائية خاصة لذوي الدخل المحدود.
2. انخفاض إنتاج البقوليات عند إصابتها بذبول فوزاريوم.
3. تكاليف التسميد والمكافحة الكيميائية وأثرها الضار على الصحة والبيئة.
4. الاتجاه العالمي نحو استخدام الريزوبيا كأحد عوامل المكافحة الحيوية، وأهميتها كمخصبات للتربة.

1-10-محدوديات البحث Research Limitations

أ. الحدود المكانية: جمعت العينات النباتية من عدة محافظات سورية، ونفذت التجارب ضمن الأصص في البيت الزجاجي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية- وزارة التعليم العالي، ونُفّذت التجارب المخبرية

في مخبر أمراض النبات البكتيرية– كلية الهندسة الزراعية– جامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية– دمشق– وزارة التعليم العالي.

ب. الحدود الزمانية: تم جمع عينات من النباتات البقولية لعزل البكتريا من عقدها الجذرية في الفترة 2019–2020، أجريت الاختبارات الكيميائية الحيوية والجزيئية والعدوى الاصطناعية في الفترة 2020–2021، بينما أجريت العدوى التصالبية في الفترة 2021–2022، ودرست البصمة الوراثية و التأثير التضادي للعزلات البكتيرية ضد العزلتين الفطريتين في الفترة 2022–2023، وتم أمثلة بعض شروط إنتاج السماد الحيوي في الفترة 2023–2024.

ج. الحدود الزراعية والحيوية: استخدمت الأصناف البلدية للنباتات البقولية في كل التجارب نصف الحقلية، بينما استخدمت عزلتين فطريتين من *Fusarium oxysporum* f *sp. ciceri* (علوش، 2018)، و 42 عزلة من بكتريا الريزوبيا، و 19 عزلة من البكتيريا الجذرية Rhizobacteria.

د. الحدود الموضوعية: دُرس في هذا البحث تعريف البكتريا المعزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية والقرابة الوراثية بينها، كما اختبرت قدرة هذه العزلات على تثبيط نمو الفطر المسبب لذبول الفوزاريوم على الحمص، وأمثلة شروط إنتاج سماد حيوي يعتمد على إحدى تلك العزلات المحلية.

الفصل الثاني

الدراسات المرجعية

Literature Reviews

يشكل تزايد معدل نمو سكان العالم ضرورة ملحة لإنتاج مزيد من الغذاء، كما أن الكثير من الترب الصالحة للزراعة في العالم لا تتمتع بظروف زراعية مثالية مثل فقدان خصوبة التربة وتغير العوامل المناخية وزيادة الآفات والأمراض وهي تحديات تواجه إنتاج الغذاء. وبالتالي فهناك حاجة إلى زيادة الإنتاج الزراعي باستخدام أساليب أكثر استدامة من الناحية الاقتصادية والبيئية مثل الأسمدة والمبيدات الحيوية وتدوير مخلفات المحاصيل، وتمثل الملقحات الريزوبية وسيلة فعالة عملياً وآمنة بيئياً وبديلة اقتصادياً لتحقيق أقصى إنتاج زراعي وخفض التلوث البيئي (Kebede, 2021; Gopalakrishnan *et al.,* 2015).

2-1-البكتيريا الجذرية Rhizobacteria:

تحوي التربة عدد هائل من الأجناس والأنواع البكتيرية, ويطلق اسم البكتريا المعززة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) على المجموعة البكتيرية القادرة على التأثير إيجابياً في نمو النبات ومناعته وإظهار خصائص تنافسية مع المجتمعات البكتيرية الأخرى في المحيط الجذري (Nagpal *et al.*, 2021).

تعزز بكتريا PGPR نمو النبات ومجموعه الجذري بشكل مباشر أو غير مباشر (Kumar and Saraf, 2015). تشمل الآليات المباشرة: توفير العناصر الغذائية من خلال العديد من العمليات الحيوية كتثبيت النيتروجين البيولوجي، وإذابة الفوسفات غير القابل للذوبان والحفاظ على متطلبات الحديد، وإنتاج الهرمونات النباتية كحمض الإندول الخلي IAA، حمض الجبريليك GA، والسيتوكينين، وتحريض المقاومة الجهازية المحرضة Inducing systemic resistance (ISR) في النباتات. أما الآليات غير المباشرة: أنشطة بكتريا PGPR والتي ينتج عنها التثبيط الحيوي للممرضات، بوساطة المستقلبات التي تنتجها كسيانيد الهيدروجين (HCN) والأمونيا (NH_3)، واكتساب الحديد عن طريق حاملات الحديد Siderophore، وإنتاج الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية للعامل الممرض (السيليولاز، الليباز، والبروتياز)، وإنتاج المضادات الحيوية،

وعديدات السكريات الخارجية، وإنتاج الإنزيمات المضادة للأكسدة مثل ديسموتاز ، الكاتلاز، البيروكسيداز والفينولات (Nagpal *et al.*, 2021; Khalifa *et al.*, 2022).

تضم هذه البكتريا العديد من الأجناس (Kumar and Saraf , 2015) منها:

Acetobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, Rhizobium, Burkholderia, Derxia, Enterobacter, Gluconacetobacter, Klebsiella, Pantoae, Pseudomonas, Rhodococcus, Serratia.

تساهم هذه المجموعة البكتيرية بالعديد من الدورات الحيوية للعديد من العناصر المعدنية في التربة كالتثبيت الحيوي للآزوت (Sharma *et al.*, 2023)، وحسب نوع العلاقة وطريقة التفاعل بين بكتريا PGPR والنبات، فهي إما أن تكون تكافلية (*Rhizobium* و *Pseudomonas* و *Bacillus*) أو غير التكافلية (*Azotobactor* و*Azospirillum*) (Nagpal *et al.*, 2021). من أهم مجموعات PGPR التكافلية والمثبتة للآزوت هي بكتريا العقد الجذرية الريزوبيا (Rhizobia) التي تشكل علاقة تعايشية مع جذور النباتات البقولية (Kingkaew *et al.*, 2023).

2-2-بكتريا العقد الجذرية (الريزوبيا-Rhizobia):

يعد العالم Beijerinck أول من استطاع عزل بكتريا الريزوبيا من العقد الجذرية لنبات البازلاء *Pisum sativum* عام 1888 وسماها *Bacillus radicicola* (Wang *et al.*, 2019). لاحقاً صنف Bergy هذه البكتريا تحت جنس *Rhizobium*، وفي عام 1889 عرّف Frank أول نوع ينتمي لهذا الجـــنس *Rhizobium leguminosarum* (Liu *et al.*, 2014) ، ومنذ ذلك الحين أطلق اسم ريزوبيا Rhizobia على البكتريا التي تشكل العقد الجذرية وتثبت الآزوت تكافلياً (Velàzquez *et al.*, 2017). إلى الآن تم تحديد 21 جنساً بكتيرياً وأكثر من 100 نـــوع من الريزوبيا(Wang *et al.*, 2019).

جدول1. الأجناس الأكثر شهرة التابعة لمجموعة الريزوبيا

(De lajudie *et al.*, 2019; Velàzquez *et al.*, 2017).

الشعبة αProteobacteri	
الفصيلة	**الجنس**
1-عائلة Bradyrhizobiaceae	*Bradyrhizobium*
2-عائلة Phyllobacteriaceae	*Mesorhizobium– Phyllobacterium–Aminobacter*
3-عائلة Hyphomicrobiaceae	*Devosia*
4-عائلة Methylobacteriaceae	*Methylobacterium – Microvirga*
5-عائلة Xanthobacteriaceae	*Azorhizobium*
6-عائلة Rhizobiaceae	*Rhizobium–Shinella– Sinorhizobium|Ensifer– Allorhizobium–Pararhizobium–Neorhizobium–*
7–عائلة Brucellaceae	*Ochrobactrum*
الشعبة ßProteobacteri	
1-عائلة Burkholderiaceae	*Paraburkholderia, Cupriavidus, Trinickia*

أما بالنسبة للصفات المزرعية للريزوبيا فهي بكتريا عصوية, أبعادها 1.2–3 ×0.5–0.9 ميكروناً, سالبة غرام, متحركة بواسطة سوط قطبي وحيد عندما تكون فتية بينما تملك الخلايا المعمرة 2–6 سياط محيطية, غير متبوغة, مستعمراتها دائرية محدبة بلون أبيض كريمي, مخاطية القوام, ويتراوح قطر المستعمرة إلى 2–4 مم بعد 3–5 أيام من الزرع على وسط yeast mannitol mineral salt agar (Hossain *et al.*, 2019; Holt *et al.*, 1994).

2–1–3–التعايش وتبادل الإشارات وتكوين العقد :

تتميز الأنواع التي تنتمي لمجموعة ريزوبيا بأنها تحمل مورثات مسؤولة عن تشكيل العقد الآزوتية *nod* على جذور النباتات البقولية وتثبيت الآزوت تكافلياً *nif*، وتحديد المدى العوائلي (Velàzquez *et al.*, 2017). تقسم مورثات التعايش إلى (Hungria and Nogueira, 2023):

1–المورثات التنظيمية Gene regulation: المسؤولة عن نسخ مورثات التعقد الأخرى، وهي بشكل رئيسي *nodD* التي تشفر بروتين يعمل كمستقبل للفلافونيد الذي يفرزه جذر النبات (Göttfert, 1993)، بالإضافة

لعدد قليل من المورثات الأخرى، مثل *nolR* في *Ensifer meliloti* و*nolA* و*nodVW* في *Bradyrhizobium japonicum* و *B. diazoefficiens* و *nrcR* في *Rhizobium tropici*.

2–المورثات المشتركة أو العامة: (*nodA*، *nodB*، *nodC*) وهي ضرورية للتعقد (تُظهر تشابه كبير من حيث التسلسل النكليوتيدي والتماثل الوظيفي بين الأنواع الريزوبية) وتشارك في التخليق الحيوي للبنية الأساسية للإشارات البكتيرية المتبادلة مع النبات (عوامل nod).

3–مورثات التعقد الخاصة بالنمط الوراثي والتي تتحكم في القدرة على تكوين عقد مع أنماط وراثية محددة فقط داخل الأنواع البقولية مثل *nodX* في *Rhizobium Leguminosarum sv. Viceae* و*nolA* في *Bradyrhizobium japonicum*.

4–مورثات تثبيت الآزوت *nif* المسؤولة عن تشفير أنزيمات نتروجيناز وأنزيم اوكسيدريدوكتاز (Shamseldin, 2013).

تتواجد مورثات التعقد وتثبيت الآزوت الأساسية في البلاسميدات plasmids أو الكروميدات chromids وذلك في الريزوبيا سريعة النمو. أما الريزوبيا بطيئة النمو مثل *Bradyrhizobium* و *Azorhizobium* فتتواجد هذه المورثات في جزر تكافلية symbiotic island على الصبغي chromosome، باستثناء *Mesorhizobium* فهي تتوضع إما على البلاسميد أو على الصبغي ضمن جزر تكافلية (Hungria and Nogueira, 2023; Shamseldin, 2013).

تتم عملية العدوى وتكوين العقد وفق المراحل التالية (الشكل1):

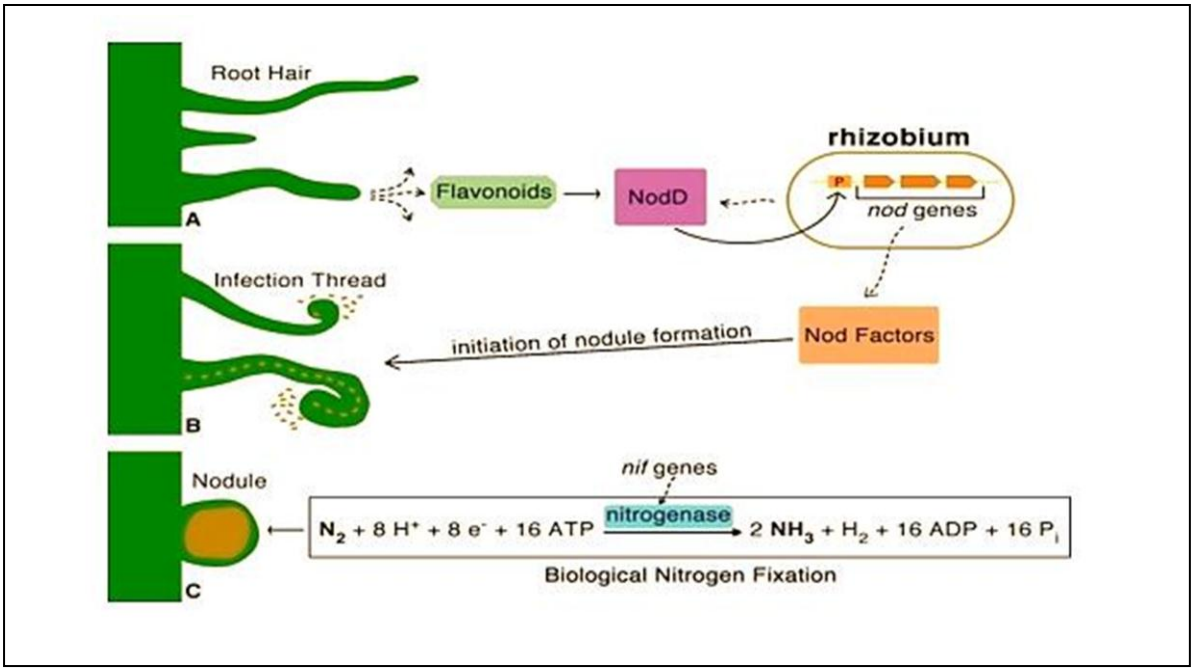
1- تعيش بكتيريا الريزوبيا بصورة حرة في التربة، وبعد إنبات بذور النباتات البقولية تفرز أغلفتها وجذورها أنواع مختلفة من الفلافونيدات التي تحث البكتريا على الاقتراب من جذور النبات ومحاولة اختراقه (Kumar *et al.*, 2023). تتحرض مورثات *nodD* البكتيرية (Via *et al.*, 2016), وتحرض بدورها بقية مورثات التعقد (*nod*، و *noe*، و *nol* تعرف جميعها باسم مورثات *nod*) على إنتاج بروتيناتها المسؤولة عن تشكيل العقد، وهي عبارة عن إشارات بكتيرية

ذات طبيعة سكريات متعددة دهنية Lipo Oligosaccharides يطلق عليها اسم factor nod.

2- يستقبل النبات العائل هذه الإشارات وتؤدي لتحريض تشكل الشعيرات الجذرية ويطلق على آلية العدوى هذه بداخل الخلوية عبر خيط العدوى (infection thread) وفي هذه الحالة تدخل البكتريا عبر الشعيرة الجذرية المشوهة بطريقة مشابهة للتحوصل (Andrews and Andrews, 2017), أما الآلية الأخرى للعدوى تسمى بصدع الدخول (crack entry) وفي هذه الحالة لا يلاحظ أي تشوه للشعيرات الجذرية بل تخترق البكتريا الجذر ما بين الخلايا من خلال الشقوق الناتجة عن انبثاق الشعيرات الجانبية (Bianco, 2014).

3- تدخل البكتيريا داخل الخلايا النباتية وتحاط بغشاء ناتج من الغشاء السيتوبلاسمي للخلية النباتية فتتحول بعد ذلك الخلية البكتيرية إلى مايسمى Bacteroid تأخذ فيه أشكال الأحرف T,Y,L,X,V (Hawkins and Oresink, 2021) وهو الطور الذي تستطيع البكتيريا من خلاله تثبيت الآزوت الجوي وتحويله إلى أمونيا في تفاعل محفز بواسطة إنزيم النيتروجيناز Nitroginase، وتحدث انقسامات لخلايا قشرة الجذر فتتشكل العقد الجذرية (Jaiswal *et al.*, 2021)

4- يمكن تصنيف العقد الجذرية في النباتات البقولية على أنها غير محدودة أو محدودة النمو (Sprent *et al.*, 2013)، حيث تحتفظ العقد غير محدودة النمو بالنسيج المرستيمي، في حين أن العقد محدودة النمو لها نسـيج مرستيمي مؤقت. يعتمد نوع العقد على النبـــات المـضيف، والأنواع البقولية التي يمكن أن تنتج عقيدات محددة وغير محددة معاً نادرة (Andrews and Andrews, 2017).



الشكل1. التفاعل بين النبات وبكتريا الريزوبيا، ودور مورثات *nod* و *nif* في عملية التعقد والتثبيت الحيوي للآزوت (**Laranjo *et al.*, 2013**).

2-1-4-المدى العوائلي :

في أوائل القرن العشرين، أجريت اختبارات لقدرة البكتريا على تشكيل العقد (التعقد) باستخدام مجموعة واسعة من النباتات المضيفة والبكتريا المختلفة، ولوحظ وجود تخصصية بين النباتات المضيفة ونوع البكتريا التكافلية. وبناءً على ذلك، اقترح مفهوم التعقد التصالبي (التلقيح المتبادل) الذي يشير إلى التخصصية بين الريزوبيا والنبات المضيف (Baldwin and Fredi, 1929; Helene *et al.*, 2022).

معظم البقوليات قادرة على تكوين عقد جذرية، وعادةً ما تكون الريزوبيا قادرة على تثبيت الآزوت ضمن هذا الارتباط التكافلي فقط. ومع ذلك، فإن العديد من أنواع البقوليات لاتشكل علاقة تعايشية فعالة إلا مع عدد قليل من الأنواع أو السلالات الريزوبية الفردية، والعكس صحيح (Walker *et al.*, 2020). يستهلك النبات لتكوين العقد طاقة كبيرة وبالتالي فإن الخيار الأفضل للنبات هو أن يتشارك فقط في التعايش مع البكتيريا التي تثبت الآزوت بكفاءة عالية وفي المقابل فإن أسلوب العلاقة الأقرب إلى التطفل قد يكون أكثر فائدة بالنسبة للبكتريا (Denison and Kiers, 2004).

هناك مجموعة من العوامل التي تلعب دوراً في تحديد المدى العوائلي للريزوبيا وهي :

- **المركبات الفلافونيدية التي ينتجها جذر النبات المضيف:** كل نبات بقولي ينتج نوع فلافونيدي محدد (Glyceollin, Phaseolin, Genistein, lueolin)، يتم التعرف عليه فقط بوساطة سلالة رايزوبية قادرة على تبادل إشارات التعايش فقط مع مضيف متوافق. وبالتالي تعمل مركبات الفلافونيد كآلية أولى لكل من المضيف والريزوبيا للعثور على شركائهم المفضلين(Walker *et al.*, 2020).
- **عوامل nod الناتجة عن مورثات nod:** تشترك عوامل nod في نفس البنية الأساسية لسلسلة chitooligosaccharide المرتبطة بحمض دهني، إلا أن البكتريا تستطيع تعديلها بشكل كبير وتشكيلها بعدة أشكال، وقد أدى هذا إلى تنوع عوامل nod بين الأنواع الريزوبية المختلفة (Long, 1996). بالتالي فإن القدرة على التعرف على عوامل nod المختلفة هي المحدد الآخر لتخصص نبات معين بالتعايش مع نوع رايزوبي معين (Walker *et al.*, 2020).
- **مستقبلات عوامل nod:** وجود مستقبلات متخصصة في المضيف متوافقة مع عوامل nod تفرزها سلالة معينة يسمح بحدوث التعايش بين هذين الطرفين دون غيرهما (Radutoiu *et al.*, 2007) .
- **التعرف على السكريات التي تفرزها الريزوبيا:** نظراً لتنوع بنية السكريات الخارجية بين أنواع الريزوبيا فمن الممكن أن تمثل التخصصية في التعرف على EPS جانبًا إضافيًا لتحديد المدى العوائلي (Downie, 2010).
- **تقييد سلالة محددة عن طريق مناعة المضيف Effector–Triggered Immunity (ETI):** مناعة المضيف (ETI) هي مرحلة من المناعة الطبيعية في النبات موجهة ضد البروتينات التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة لزيادة شدة المرض أو التحايل على مناعة المضيف(Cui *et al.*, 2015). بعض البقوليات ربما تكون قد طورت بروتينات خاصة تكتشف بروتينات ريزوبية لسلالات غير متوافقة تعايشياً فتنشط الاستجابات الدفاعية لمنعها من دخول الجذر، وبالتالي تكون بمثابة آلية أخرى للتحكم في المدى العوائلي (Walker *et al.*, 2020).

- **تحكم النبات بالظروف المعيشية المناسبة للسلالة الرايزوبية على أساس كفاءتها بتثبيت النيتروجين:**

يطبق النبات العديد من الضغوط على السلالات غير المتوافقة مثل توجيه نواتج التمثيل الضوئي للعقد المنتجة، أو إزالة غاز الآزوت، والتقليل من نفاذية الأوكسجين في العقد غير المنتجة لتنخفض أعداد الخلايا البكتيرية غير المتوافقة وينخفض عدد العقد التي تشكلها(Oono *et al.*, 2011).

جدول2. بعض العوائل البقولية المزروعة والبرية للريزوبيا (Andrews and Andrews, 2017) **معدل.**

النبات البقولي العائل	الجنس الرايزوبي المتعايش
Cicer arietinum الحمص	*Mesorhizobium*
Lens culinaris العدس	*Rhizobium*
Pisum sativum *البازلاء*	*Rhizobium*
Vicia faba الفول	*Rhizobium*
Medicago sativa البرسيم الحجازي	*Ensifer, Neorhizobium, Rhizobium*
Medicago truncatula الفصة البرميلية	*Ensifer*
Lupinus albus الترمس	*Bradyrhizobium*
Arachis hypogaea الفول السوداني	*Bradyrhizobium, Rhizobium*
Arachis duranensis الفول السوداني	*Bradyrhizobium*
Glycine max فول الصويا	*Bradyrhizobium, Ensifer, Rhizobium*
Phaseolus vulgaris الفاصولياء	*,Bradyrhizobium, Burkholderia, Ensifer Pararhizobium, Rhizobium*
Phaseolus lunatus الفاصولياء	*Bradyrhizobium, Rhizobium*
Sesbania sericea سيسبان	*Mesorhizobium, Rhizobium*
Sesbania aculeate سيسبان	*Ensifer*
Trifolium pretense النفل	*Phyllobacterium*
Trifolium repens النفل	*Bradyrhizobium, Ensifer, Rhizobium*
Astragalus mongholicus القتاد	*Mesorhizobium*
Astragalus complanatus القتاد	*Ensifer, Mesorhizobium, Rhizobium*

2-1-5-أهمية بكتريا الريزوبيا :

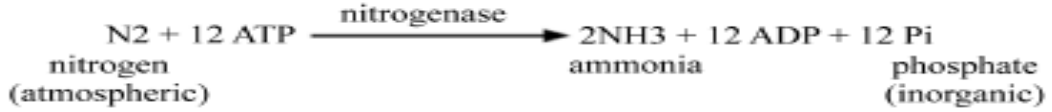
أ- تثبيت الآزوت:

تستخدم جميع النباتات الآزوت على شكل NO3 و+NH4 وتحصل على معظم احتياجاتها من الجو حيث يشكل الآزوت 80% من غازات الغلاف الجوي ويوجد 6400 كغ منه فوق كل هكتار من الماء أو اليابسة،

ولكن على الرغم من هذه الوفرة في الجو فنادراً ما يوجد هذا العنصر في التربة على صورة نترات وأملاح الأمونيوم بكمية تفي احتياجات النباتات الخضراء (Leghari *et al.*, 2018). كما يعد الآزوت من أهم العناصر الغذائية اللازمة للنبات حيث ترتبط جميع العمليات الحيوية في النباتات بالبروتينات والأحماض النووية اليخضور والأنزيمات والهرمونات والأحماض الأمينية التي يعد الآزوت مكونًا أساسيًا فيها. وبالتالي للحصول على المزيد من إنتاج المحاصيل، فإن استخدام الآزوت أمر لا غنى عنه (Leghari *et al.*, 2018).

يعد استخدام البكتريا المثبتة للآزوت من أهم الحلول الحديثة لتحسين انتاجية المحاصيل والتقليل من التلوث البيئي بالأسمدة الكيميائية حيث تستخدم الريزوبيا حوالي 10% فقط من الآزوت المثبت لبناء خلاياها والباقي يفرز خارجها, وتثبت حوالي 270 مغ آزوت / غ سكر مستهلك. تعتبر الريزوبيا المتعايشة مع جذور البقوليات البرية أكثر نشاطاً في تثبيت الآزوت وأكثر تحملاً للإجهاد الملحي ودرجات الحرارة المرتفعة و الجفاف من تلك المتعايشة مع البقوليات المزروعة (Zahran, 1999).

يقدم النبات للبكتيريا مصدر الكربون والطاقة والأحماض العضوية وغير العضوية (Wang *et al.*, 2019) فيما تحول البكتريا الآزوت الجوي N2 إلى أمونيا وهو الشكل الذي يستفيد منه النبات وذلك من خلال عملية تسمى التثبيت الحيوي للآزوت Biological nitrogen fixation (BNF) (الشكل2)، ومما يجعلها واحدة من أهم العمليات الحيوية على سطح الأرض وعلى مستوى العالم مساهمتها بـ $33-46\times10^9$ كغ من الآزوت/سنة من خلال التفاعل والتعايش بين البقوليات والريزوبيا (Herridge, 2008).



الشكل2. المسار الحيوي لاختزال الأزوت وتكوين الأمونيا بواسطة الأحياء الدقيقة المثبتة للآزوت الجوي (Mmbaga *et al.*, 2014).

ب- إفراز الأحماض العضوية والأنزيمات:

يتم ترسيب الفوسفات في التربة بارتباطه مع Ca^{+2} وMg^{+2} و Fe^{+3} وAl^{+3} وحبيبات الطين، ليشكل مركبات معقدة غير قابلة للذوبان مثل فوسفات ثلاثي الكالسيوم $Ca_3(PO4)_2$ و (FePO4.2H2O) و(AlPO4.2H2O)، مما يؤدي إلى نقص هذا العنصر وبالتالي نقص إنتاج المحاصيل (Jones and Oburger, 2011). لذلك فإن البديل الأمثل لتعويض فقر التربة بالفوسفات هو استخدام الكائنات الحية الدقيقة في منطقة الجذور كالريزوبيا، والتي تحول الأشكال غير القابلة للذوبان إلى أشكال متاحة للنباتات، مما يزيد من خصوبة التربة وإنتاجها ويقلل من الأضرار البيئية والاقتصادية (Sindhu *et al.*, 2014; Posso *et al.*, 2017).

الآلية الرئيسية التي تستخدمها هذه الكائنات الحية الدقيقة لإذابة مركبات الفوسفات المعقدة هي إنتاج أنزيمات (Phosphatases) والعديد من الأحماض العضوية كحمض الغلوكونيك، والستريك، والماليك، والمالونيك، والأكساليك، والسكسينيك، واللاكتيك، والطرطريك، تؤدي هذه الأحماض لخفض pH المحيط الجذري (Jones and Oburger, 2011) وبالتالي إطلاق الفوسفور المترسب أو المقيد ضمن معقد, وهذا يعد نوعاً من التخصيب الحيوي للترب بعنصر الفوسفور (Mardad *et al.*, 2013).

ت- إنتاج الهرمونات النباتية:

تنتج أكثر من 80٪ من بكتيريا الجذور مثل *Azospirillum* و*Pseudomonas* و*Klebsiella* و*Rhizobium* و*Mesorhizobium* و*Bradyrhizobium* و*Paenibacillus* و *Sinorhizobium* و*Bacillus* هرمونات الأوكسينات والسيتوكينين والجبرلينات والأبسيسيك والايثيلين (Malik, 2021; Jeyanthi and Kanimozhi, 2018; Tatsukami and Ueda, 2016; Fahde *et al.*, 2023).

ث- إنتاج حاملات الحديد Siderophore:

تطلق معظم البكتريا الجذرية بمافيها الريزوبيا جزيئات سيديروفور Siderophore خارج خلاياها للتغلب على نقص الحديد فترتبط هذه الجزيئة المخلبية بالحديد الثلاثي Fe^{+3} ويدخل المعقد إلى سيتوبلاسما الخلايا ليتحول من الشكل غير القابل للإفادة (Fe+3) إلى الشكل المتاح بإرجاعه إلى (Fe+2) وتستفيد منه في نموها وكذلك تعزز من استفادة النبات من الحديد وبالتالي تعزز نمو النبات (Kumar and Saraf, 2015).

كما أنه عامل فعال في المكافحة الحيوية حيث يشارك بشكل غير مباشر في تثبيط تطور مسببات الأمراض من خلال ارتباطه مع $Fe3^{+}$ مما يحد من توافر الحديد للعوامل البكتيرية والفطرية الأخرى المسببة للأمراض النباتية وبالتالي يمنع نموها (Hamid *et al.*, 2021).

ج- زيادة مقاومة النبات للمسببات المرضية الموجودة في التربة Soil borne pathogens مثل: *Fusarium*, *Rhizobium*, *Sclerotium*, *Macrophomina* ، أو زيادة قدرة النبات على تحمل الإصابة (Das *et al.*, 2017).

يعزى النشاط التضادي للريزوبيا إلى مجموعة متنوعة من الآليات المباشرة وغير المباشرة. تشمل الآليات المباشرة: اكتساب العناصر الغذائية (تثبيت الآزوت حيوياً، وإذابة الفوسفات غير القابل للذوبان وإرجاع الحديد)، وإنتاج الهرمونات النباتية (حمض الإندول أسيتيك IAA، حمض الجبريليك GA والسيتوكينين) وتحريض المقاومة الجهازية المستحثة (ISR) في النباتات. أما الآليات غير المباشرة فهي مرتبطة بماتنتجه الريزوبيا من المستقلبات الثانوية كسيانيد الهيدروجين (HCN) والأمونيا (NH3)، وإنتاج Siderophore الذي يحرم العامل الممرض من الاستفادة من الحديد، وإنتاج الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية (السيليولاز، الليباز، البروتياز)، وإنتاج المضادات الحيوية (trifolitoxin، rhizobiotoxin) (Deshwal *et al.*, 2003; Fahde *et al.*, 2023)، وزيادة تعبير المورثات المرتبطة بالدفاعات النباتية التي تحصن النبات ضد الممرضات (Gopalakrishnan *et al.*, 2015)، وتراكم المركبات الفينولية و فيتوألكسينات والفلافونيدات وتنشيط الأنزيمات المضادة للأكسدة مثل L-phenylalanine ammonia lyase (PAL) و Chalcone

synthase (CHS) و Peroxidase (POX) (الدّوس, 2016) و Polyphenol oxidase (PPO) و Superdesmotase (Das *et al.*, 2017) (Nagpal *et al.*, 2021).

حيث أشار Tamiru and Muleta (2018) إلى أن تلقيح الفول البلدي بعزلات ريزوبيا أدى إلى تثبيط نمو فطر *Fusarium solani* في الزجاج، وكان متوسط انخفاض شدة المرض عند تطبيق مزيج من سلالات الريزوبيا 45.1% مقارنة بـ 29.2% للسلالات الفردية (Kebede, 2021).

كما أثبت Gopalakrishnan وآخرون (2015) أيضًا أن التلقيح بـ *Bradyrhizobium japonicum* و*Rizobium Leguminosarum* و*Rhizobium meliloti* يمكن أن يكافح الفطريات التي تصيب البامية وعباد الشمس مثل *Macrophomina phaseolina* و*Rhizoctonia solani* و*Fusarium solani*.

كذلك أشار Osdaghi وآخرون (2011) إلى أن تلقيح الفاصولياء باللفحة البكتيرية الشائعة *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli* (CBB) مع *Rhizobium Leguminosarum bv. phaseoli* قلل بشكل كبير من شدة المرض في كل من تجارب البيت الزجاجي والتجارب الحقلية. أوضح Díaz-Valle وآخرون (2019) أن تلقيح الفاصولياء باستخدام *Rhizobium etli* يثبط شدة اللفحة البكتيرية مقارنة بالنباتات غير الملقحة بالبكتيريا.

ذكر Noreen وآخرون (2016) أن انخفاض أعداد نيماتودا تعقد الجذور في الحمص كان نتيجة لتلقيح النباتات بالريزوبيا، بينما كشف Volpiano وآخرون (2019) أن التلقيح بـ *Rhizobium* يمكن أن يقلل حوالي 96% من الأورام النيماتودية على جذور الباذنجان (*Solanum melongena*) المصاب بـ *Meloidogyne incognita*.

2-2-مرض ذبول فوزاريوم (*Fusarium* – Ascomycota- Sordariomycetes- Hypocreales- Nectriaceae):

الفوزاريوم هو جنس من الفطريات الخيطية الزقية، التي تضم العديد من مسببات الأمراض النباتية الهامة وكذلك المنتجة للسموم الفطرية في أغذية الإنسان والحيوان (Sampaio *et al.*, 2020). يعد الذبول واللفحة وتعفن الجذور والتقرحات من بين الأعراض التي يسببها هذا الجنس على النبات وهو واسع الانتشار في جميع أنحـــاء العالم، كما يضـــم جنس فوزاريوم أنـــواع مختلفـــة منـــها *F. solani* و *F. graminearum* و *F. oxysporum* (Ma *et al.*, 2013).

ينتج فطر فوزاريوم ثلاثة أنواع من الأبواغ اللاجنسيّة تعتبر أهم صفة تعريفية للفطر وهي:

-الأبواغ الكونيدية الكبرى Macroconidia مغزلية الشكل Fusiform أو اسطوانية متعددة الحواجز تنشأ على حامل كونيدي Conidiophores.

-الأبواغ الكونيدية الصغرى Microconidia وتتميز بشكلها البيضوي أو الذي يشبه الكلية.

-الأبواغ الكلاميدية Chlamydospores وتتميز بشكلها الدائري وجدارها السميك والتي تتكون طرفياً أو بينياً في الهيفات (Ismail *et al.*, 2015) .

يعتبر *Fusarium oxysporum* (Fo) أحد مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق التربة إلى كل مكان ويسبب الذبول الوعائي لمجموعة واسعة من الأنواع النباتية، وهو أكثر أنواع فوزاريوم شيوعًا(Agrios, 2005). يضم أكثر من 120 نمط شكلي (f. sp.) حددت اعتماداً على التخصص بالأنواع النباتية العائلة (Michielse, 2009)، ونظراً للأضرار التي يسببها فقد احتل المرتبة 10 في قائمة أكثر مسببات الأمراض النباتية ذات الأهمية العلمية والاقتصادية (Dean *et al.*, 2012).

يتميز فوزاريوم بدرجة عالية من التخصص العوائلي، إلا أن بعض الأنماط الشكلية Fo f. sp. يمكن أن يكون لها مدى عوائلي واسع، وتصيب أكثر من نوع واحد (Sampaio *et al.*, 2020) مثل Fo f. sp. *pisi* الذي يصيب البازلاء ويستطيع أن يصيب الحمص أيضاً (De Curtis *et al.*, 2014). بعض Fo f. sp. مثل f. sp. *ciceris* تعتبر وحيدة العائل في الأصل، ولكنها لا تزال تظهر تباينًا كبيراً لتسبب المرض على

نطاق واسع من العوائل (Demers *et al.*, 2014). تم التمييز بين نوعين من الأنماط المرضية بناءً على الأعراض المرضية على النبات وهي الاصفرار أو الذبول، حيث تنتمي السلالات (0, 1B/C) إلى النمط المرضي (الاصفرار) بينما تنتمي السلالات (1A،2،3،4،5،6) إلى النمط المرضي (الذبول) (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

من المحتمل أنه إذا تم اختبار المزيد من العوائل المحتملة لفطر الفوزاريوم وإجراء العدوى التصالبية على المزيد من البقوليات، فسيكون هناك المزيد من Fo f. sp. لن ترتبط فقط بنوع واحد من البقوليات، وقد يكون هناك العديد من الأنواع التي حتى عندما لا تظهر عليها الأعراض، يمكن أن تسمح باستعمار الجذور والساق، مما قد يكون له تأثير مباشر على تراكم اللقاح الممرض وتكون بمثابة نواقل للعامل الممرض (Jiménez-Díaz *et al.*, 2015).

2-3- المكافحة الحيوية لفطر ذبول فوزاريوم *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Fo) باستخدام الريزوبيا:

تعاني البقوليات العديد من الضغوط الحيوية وغير الحيوية (Nair *et al.*, 2019)، وتضم الأمراض الرئيسية التي تصيب البقوليات البياض الدقيقي والزغبي، وعفن بوتريتيس الرمادي، وعفن الجذور، ولفحة الأسكوكيتا، والانتراكنوز، والصدأ، والذبول، والآفات البكتيرية، وأمراض الموزاييك الفيروسية. بالإضافة إلى الديدان الخيطية، والأعشاب الطفيلية، والحشرات الثاقبة الماصة (Kaur *et al.*, 2023).

من بين الأمراض التي تصيب البقوليات ذبول الفوزاريوم الناجم عن العامل الممرض الذي ينتقل عن طريق التربة *Fusarium oxysporum* ، والذي يعد أحد العوامل الرئيسية التي تحد من الإنتاج على مستوى العالم (Sampaio *et al.*, 2020). يعتبر Fo f. sp. *pisi* مرضاً مدمرًا للبازلاء *Pisum sativum* L. في كل البلدان التي تزرع البازلاء وتتوفر فيها الظروف المناسبة لهذا الفطر (Haglund and Kraft, 2001)، وكذلك يصيب Fo f. sp. *phaseoli* الفاصوليا بخسائر كبيرة (Alves-Santos *et al.*, 2002)، كما يصاب نبات الحمص *Cicer arietinum* L. الذي يعتبر ثاني أهم المحاصيل البقولية عالمياً بفطر

Fo f. sp. *ciceris* وقد تصل الخسائر السنوية في ظل الظروف البيئية المناسبة إلى 100٪ (Navas-Cortés *et al.*, 2000)، ويصاب العدس *Lens culinaris* Medik بالذبول الوعائي الناجم عن الفطر Fo f. sp. *lentis* (Taylor *et al.*, 2007)، كما تصاب الفصة أو البرسيم الحجازي *Medicago sativa* L. والفصة البرميلية *M. truncatula* L. بمسبب الذبول Fo f. sp. *medicaginis* (Ramírez-Suero *et al.*, 2010).

لاحظ Das وآخرون (2017) ازدياد نسبة إنبات بذور نبات الحمص ونموه بعد التلقيح ببكتريا *Mesorhizobium ciceri* نتيجة لزيادة إنتاج الأمونيا وهرمون حمض الإندول الخلي كما ازدادت نسبة الأنزيمات الدفاعية مثل البيروكسيداز وفينيل ألانين أمونيالياز وكذلك النشاط المضاد للفطر *F. oxysporum* f sp. *ciceri*.

وعندما درس Pawar وآخرون (2014) تأثير بكتريا *Rhizobium* على فطر *Aspergillus niger* و *F. oxysporium* لم تسبب البكتريا أي تأثير على بكتريا المحيط الجذري، ولكنها ثبطت نمو الفطريات الممرضة وهذا يدل على إنتاج الرايزوبيوم لمركبات مضادة للفطريات.

بينما عزل Kumari و Khanna (2014) 40 عزلة بكتيرية من جذور نبات الحمص واختبرت تجاه فطر *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* فأظهرت 28 عزلة منها نشاطاً تضادياً تراوح بين 14.8-18.2 % بالمقارنة مع الشاهد كما لوحظ زياد في انتاج المركبات المضادة للفطريات مثل كاتيكول وسيديروفور و HCN. كما أظهرت بكتريا *Rhizobium* المعزولة من عدة محاصيل بقولية كالعدس والفاصولياء والحمص واللوبياء قدرتها على تثبيط نمو عدة سلالات من فوزاريوم وكانت السلالة البكتيرية المعزولة من نبات الفاصولياء أكثرها فعالية (kucuk and Cevheri, 2015).

2-5-التباين الوراثي في بكتريا الريزوبيا وتقانة البصمة الوراثية rep-PCR DNA Fingerprinting technique :

تحتوي الجينومات البكتيرية على مجموعة متنوعة من تسلسلات الحمض النووي المكررة repetitive DNA sequences ، وتمثل ما يصل إلى 5٪ من الجينوم (Ussery *et al.*, 2004)، وتشير البيانات الحديثة إلى أن بعض هذه العناصر المتكررة قد تشارك في تخليق أو تحطيم الحمض النووي الريبي RNA و الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين DNA (Tobes and Ramos, 2005) ، أو قد تكون وسيط في تطور الجينوم (Schmidt and Anderson, 2006).

تتكون هذه العناصر المتكررة من مورثات مكررة، وتختلف أحجام العناصر المتكررة من 15 أساس (تكرارات ثلاثية النوكليوتيدات لخمس مرات) إلى مئات الأزواج من الأسس (عنصر RLEP) (Versalovic and Lupski, 1998). كشف تحليل تسلسل الجينوم للعديد من الأنواع البكتيرية عن وجود العديد من التسلسلات المتكررة في نطاق واسع من الأنواع البكتيرية مثل repetitive extragenic palindromic (REP) في حين أن بعض العناصر المتكررة (مثل RLEP) موجودة في مجموعة محدودة فقط من البكتيريا (Tobes and Ramos, 2005).

تستخدم معظم دراسات rep-pcr fingerprinting ثلاث مناطق مكررة كمواقع تمهيدية لتفاعل PCR وهي: سلسلة Repetitive extragenic palindromic (**REP**) (التكرارات المتماثلة الواقعة خارج منطقة المورثات) وهي سلسلة قصيرة ثلاثية النوكليوتيدات5(GTG) وزنها الجزيئيbp 40-35 ، وسلسلة (**ERIC**) enterobacterial repetitive intergenic consensus (التكرارات الواقعة داخل منطقة المورثات) وزنها 127-124 bp، وعناصر **BOX** وزنها الجزيئي 154 bp وهي عناصر متكررة فسيفسائية تتكون من مجموعات مختلفة من ثلاث تسلسلات فرعية، هذه التسلسلات الفرعية الثلاث هي boxA وboxB وboxC والتي يبلغ طولها 59 و45 و50 نوكليوتيدًا على التوالي (Versalovic *et al.*, 1994; Rademaker *et al.* 2008, Bilung *et al.*, 2018).

نظراً لأن كل سلالة أو عزلة بكتيرية لها تسلسلات متكررة تقع في مناطق مختلفة من الجينوم الخاص بها فإن استخدام تقانة repetitive extragenic palindromic PCR rep-PCR يولد أمبليكونات متعددة تختلف

في الحجم بما يتناسب بشكل مباشر مع المسافات المشفرة المتوضعة بين السلاسل المكررة، وبعد ترحيل نواتج PCR يشير توزع الحزم على الهلامة إلى نمط معين مشابه للباركود يعتبر بصمة للحمض النووي DNA خاصة لكل سلالة أو عزلة بكتيرية (Rademaker *et al.*, 2008).

لتحليل البصمة الوراثية لـ rep–PCR ميزات عديدة أهمها الحصول على نفس النتائج بتكرار الاختبار داخل وبين المخابر وبسيطة جداً لتمييز السلالات ولدراسة التنوع الوراثي (Louws *et al.*, 1994)، حيث وصلت فعاليتها في التنميط حتى تحت النوع والسلالة (Rademaker *et al.*, 2005)، وتفيد أيضاً في دراسة التوزع الجغرافي للطرز البكتيرية في الحقول وقياس المستوى العالي من التنوع (Adhikari *et al.*, 2012). كذلك لا تعتمد هذه التقانات على DNA ذي نوعية عالية بشكل مطلق (خالي من البروتين والبولي سكاريد) حيث أن النتائج متماثلة سواء أكانت لـ DNA نقي أو مستعمرات مفردة من أطباق أو من مزارع سائلة (Louws *et al.*, 1994).

تم استخدام تقنية rep–PCR لفحص التنوع الوراثي بين البكتيريا المثبتة للآزوت، بما في ذلك الأنواع ضمن الجنس *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* (Sadowsky and Hur, 1998) وقد ثبت أنها مفيدة في فحص السلالات المثبتة للآزوت والمعزولة من مصادر مختلفة جغرافياً وبيئياً وفيزيولوجياً (Vanparys *et al.*, 2007).

عزل Yan وآخرون (2007) 112 عزلة من الريزوبيا المتعايشة مع نبات *Caragana* spp. في الصين ووصفها باستخدام تقانة BOX–PCR إلى 11 نوع من بكتريا *Mesorhizobium*.

درس Nick وآخرون (1999) القرابة الوراثية بين51 عزلة ريزوبيا عزلت من العقد الجذرية *Acacia Senegal* و *Prosopis chileirsis* في السودان وكينيا مع 15 نوع رايزوبي مرجعي باستخدام عدة تقنيات منها تقنية rep–pcr واتبعت 17 عزلة معزولة من السودان إلى بكتريا *Sinorhizobium*.

صنفت Menna وآخرون (2009) 68 عزلة من الريزوبيا باستخدام Box –pcr, وكانت هذه التقنية فعالة في التوصيف الأولي لمجموعات الريزوبيا و التحكم في جودة اللقاح المنتج, وأعلى نسبة تشابه بين سلالات الأنواع المختلفة كانت 70%.

أجرى Ogutcu وآخرون (2009) دراسة لتحديد الاختلافات الشكلية والوراثية لبكتريا *Rhizobium leguminosarum subsp. ciceri* المعزولة من جذور الحمص البري في تركيا باستخدام تقانات rep–PCR (Rep–Eric–Box) فأظهرت النتائج تنوع عالي ضمن النوع.

استخدمت Lorite وآخرون (2010) تقانات rep–pcr بهدف توصيف التنوع الظاهري والوراثي للبكتريا المتحملة للملوحة والمتعايشة مع النبات العلفي *Lotus* sp., حيث عزلت 180 عزلة أظهرت النتائج ارتباطها مع أنواع مختلفة من أجناس *Mesorhizobium* : *M. tarimense*, *M. tianshanese*, *M. chacoense/M. albiziae*, *M. alhagi*.

2–6– اللقاح الرايزوبي:

أكدت العديد من الدراسات أن استخدام الريزوبيا كملقح يمكن أن يزيد من كفاءة العمليات التكافلية، ويمكن أن يعزز بشكل كبير نمو المحاصيل، وتطورها وإنتاجيتها من خلال آليات عمل مختلفة (Uddin *et al.*, 2014; Singh and Singh, 2018)، ولذلك يمكن استخدام الملقحات الريزوبية لحل مشكلات خصوبة التربة وتقليل استخدام الأسمدة الآزوتية الصناعية لخفض التلوث البيئي (Wolde–meskel *et al.*, 2018; Matse *et al.*, 2020)، بالإضافة إلى أن سعر اللقاح لا يتجاوز 1% من إجمالي تكلفة المدخلات الزراعية (Lindeque, 2007). تحتوي اللقاحات الريزوبية عادة على خلايا حية نشطة أو ساكنة يتم تشكيلها كلقاحات بتحميلها على مادة حاملة مناسبة (Ahemad and Kibret, 2014; Kihara, 2019).

أشارت الدراسات إلى أن تحضير اللقاح البكتيري واحتفاظ هذا اللقاح بحيويته، يعتمد على اختيار السلالة المناسبة (السلالات المختلفة لديها قدرة متفاوتة على النمو في ظروف بيئية مختلفة)، والمادة الحاملة (التي

تؤثر بشكل مباشر على حيوية اللقاح)، وتأمين شروط تخزين مناسبة من درجة حرارة ورطوبة (Mawar *et al.*, 2021; Rojas-Sánchez *et al.*, 2022).

فيما يتعلق بالمادة الحاملة فلابد أن تتوفر فيها عدة شروط (Khan *et al.*, 2023; Bethke and Cullinan, 2023):

- غير سامة للكائنات الحية والنبات.
- سهلة التعقيم ومتوفرة بكميات كافية ومنخفضة التكلفة وحجم جزيئاتها صغير.
- توفر التصاق جيد على البذور والمحافظة على حيوية البكتيريا الملقحة.
- قدرة تخزين مؤقت جيدة، و قدرة على الاحتفاظ بالرطوبة وبدرجة الحموضة المناسبة.

في البداية استُخدم الجيلاتين عام 1896 كمادة حاملة للقاح البكتيري في الإنتاج التجاري للسماد الحيوي في الولايات المتحدة الأمريكية، استبدل لاحقاً بالتورب حتى التسعينيات (Khan *et al.*, 2023).

في الوقت الحاضر هناك أنواع مختلفة من المواد الحاملة المستخدمة حسب الشكل النهائي للسماد الحيوي (صلب، سائل، حبيبات). تعتمد المواد الحاملة الصلبة على مواد شبيهة بالتربة مثل: التربة، والتورب، والفحم، والطين، والحجر الكلسي (Hartley *et al.*, 2004)، وبعضها يعتمد على المواد العضويـــة (نشارة الخشب، والسماد العضوي، والفحم النباتي، والكيتـوزان (Bashan *et al.*, 2002; Power *et al.*, 2011)، أو المواد غير العضوية مثل التالك، والفيرميكوليت، والسيليكا، والكاولين، والبيرلايت (Smith, 1992; Mishra and Arora, 2016)، أما المواد الحاملة السائلة فتعتمد على أوساط الزرع المغذية، والزيوت المعدنية والعضوية، وخليط الزيت والماء، والمعلقات (Allouzi *et al.*, 2022). كما يجب ألا تقل فترة التخزين المثلى للقاح البكتيري على المادة الحاملة المناسبة عن 2-3 أشهر كحد أدنى (Khan *et al.*, 2023)، مع احتفاظ المادة الحاملة برطوبة عالية ودرجة حموضة PH قريبة من 7 (Arora *et al.*, 2014; Sohaib *et al.*, 2020)، وتوفير درجة حرارة منخفضة أثناء التخزين (Wong *et al.*, 2019).

أجرى Khavazi وآخرون (2007) تجارب لتقييم مواد حاملة مختلفة غير مكلفة ومتاحة (البيرلايت، وخليط من بقايا البيرلايت والشعير، وتفل قصب السكر، والفحم، وقشر الأرز), وتمت مراقبة حيوية السلالة *Bradyrhizobium japonicum* CB1809 على تلك المواد لمدة 6 أشهر عند تخزينها عند 4°س. تمكنت معظم المواد الحاملة من الحفاظ على البكتريا بتركيز أعلى من 1×10^{9} لكل غرام من اللقاح خلال فترة الحفظ، وكانت أفضل مادة هي خليط البيرلايت مع تفل قصب السكر أو بقايا الشعير.

كذلك اختبر Kihara (2019) حيوية سلالتين من *Bradyrhizobium* spp. (532C و USDA110) على عدة مواد حاملة (التورب، المولاس، قشور نبات الكسافا *Manihot esculenta* ، وسط مستخلص الخميرة والمانيتول السائلYM) لمدة 6 أشهر عند درجات حرارة مختلفة (−20 و 4 و 25 و 30 و 40 °س)، فلاحظ انخفاض في التعداد البكتيري مع مرور الزمن، فكـانت أفضـــل درجة حـــرارة للحفظ هي 4 و −20 °س خلال كامل فترة الدراسة، و ترتيب المواد الحاملة حسب أيها أكثر قدرة على الاحتفاظ بالبكتريا هو (وسط YM ، المولاس، قشور نبات الكسافا، التورب على التوالي).

كما لقحت عزلتين من *Rhizobium* (MPR8 وTFR3) على الفحم ونشارة الخشب والتربة وتفل قصب السكر، فكانت الأخيرة أقلها قدرة على الحفاظ على تعداد جيد للبكتريا 10^{3} بعد 240 يوم من بدء التجربة (Paudyal *et al.*, 2021).

يعد إنتاج وجودة اللقاحات الريزوبية في العديد من البلدان النامية محدود بسبب عدم توافر المواد الحاملة المناسبة أو القيود الاقتصادية على مستلزمات إنتاجها (Khavazi *et al.*, 2007)، وبالتالي لابد من العمل لإنتاج هذه اللقاحات محلياً بأعلى جودة وبأقل التكاليف والمستلزمات.

الفصل الثالث

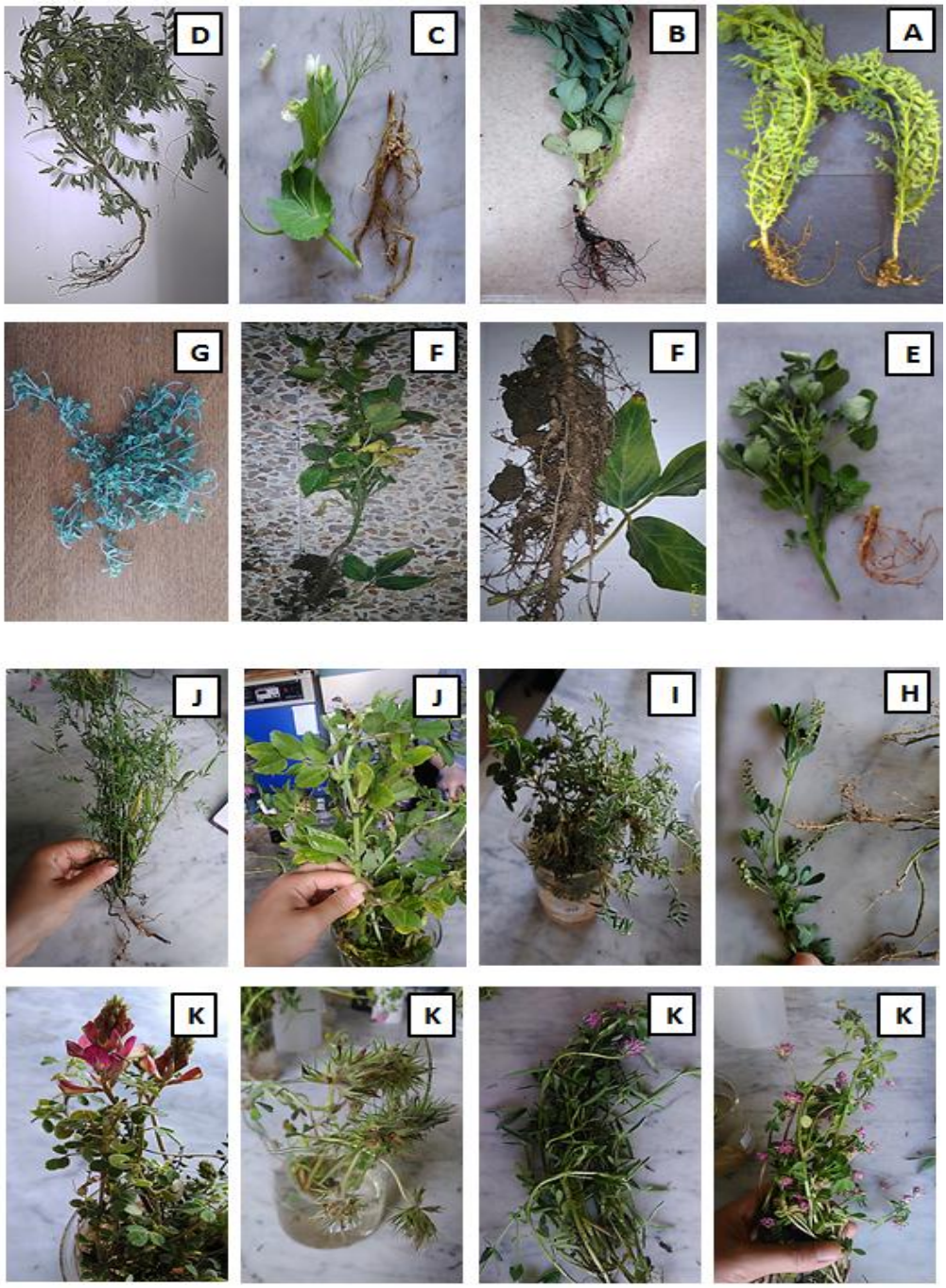
مواد وطرائق البحث

Materials and Methods

تم تنفيذ البحـــث خـــلال الفترة 2018– 2023 في مخبر أمراض النبـــات البكتيرية في كلية الهندســـة الزراعيـــة–جامعة دمشق، ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية (مختبر التنوع الحيوي، مختبر البيولوجيـــا الجزيئية).

3–1– جمع العينات النباتية:

جمعت عينات عشوائية من النباتات البقولية بعمر6–8 أسابيع لعام 2019 و 2020 من عدة مناطق في الجمهورية العربية السورية, وضعت العينات في أكياس بلاستيكية مع بطاقة تحتوي على رقم العينة ومنطقة الجمع وتاريخ أخذ العينة وتم نقلها إلى المختبر (جدول 8، الشكل 3).



الشكل 3. العينات النباتية للمحاصيل البقولية المزروعة والبرية المجموعة حيث:

A: حمص *Cicer arietinum*، B: فول *Vicia faba* ، C: بازلاء *Pisum sativum*، D: عدس *Lens culinaris*

E: الفصة *Medicago sativa*، F: فول الصويا *Glycine max*، G: حلبة *Trigonella foenumgraecum*

H: حندقوق *Melilotus officinalis*، I: قتاد *Astragalus sp.* ،J: بيقية *Vicia sp.*، K: نفل *Trifolium sp.* .

3-2-عزل البكتريا:

تم فصل الجذر عن المجموع الخضري، وغُسلت الجذور من التراب تحت الماء الجاري، وعُقمت سطحياً باستخدام الكحول الإيتيلي 70% لمدة دقيقتين، ثم هيبو كلوريت الصوديوم 1.5% لمدة 5 دقائق، وأخيراً الغسل بالماء المقطر المعقم.

وضعت الجذور المعقمة ضمن جفنة معقمة، وأضيف 2 مل من الماء المقطر المعقم وطحنت، وتركت بماء الطحن 5 دقائق، ثم أخذ 100 ميكروليتر، وحضرت التخفيفات التالية 10/1، 100/1، 1000/1، ونشر25 ميكروليتر من التخفيف 1000/1 على طبق يحوي وسط الخميرة والمانيـــتول مضافاً له أحمر الكونـــغو(1%) Yeast Manitol Agar (YMA) (Islam, 1984).

حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28° س لمدة 48 ساعة، ونقلت المستعمرات المنفردة إلى أطباق جديدة ورُمزت وحضنت بنفس الشروط السابقة، وتمت دراسة الصفات المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية النامية.

3-3-تعريف البكتريا بالطرائق الكيميائية الحيوية:

تم تعريف البكتيريا باستخدام عدة اختبارات كيميائية حيوية وهي:

3-3-1-اختبار غرام GRAM reaction: (Hossain *et al.*, 2019)

هَدَفَ هذا الاختبار للتمييز بين البكتريا سالبة وموجبة غرام.

3-3-2-اختبار الكاتالاز Catalase Test: (Hossain *et al.*, 2019)

عَرّف هذا الاختبار البكتريا المنتجة لأنزيم Catalase الذي يفكك بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى ماء وأوكسجين فتظهر فقاعات الأوكسجين.

3-3-3-اختبار الأوكسيداز Oxidase Test: (Hossain *et al.*, 2019)

عُرّفت باستخدام هذا الاختبار البكتريا المنتجة لأنزيم Oxidase بظهور اللون البنفسجي أو الأزرق بعد 10 ثواني من مزج الكاشف مع المستعمرة البكتيرية.

3-3-4-اختبار تحلّل الجيلاتين Gelatin hydrolysis: (Hossain *et al.*, 2019)

تم إجراء هذا الاختبار للتأكد من قدرة البكتريا على إنتـــــاج أنزيم الجيلاتيناز المحلل للجيلاتين.

3-3-5-اختبار تحلّل النشاء Starch hydrolysis: (Hossain *et al.*, 2019)

أجري هذا الاختبار على وسط نشاء آغار للتأكد من قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم الأميلاز المحلل للنشاء واستخدامه كمصدر للكربون.

3-3-6-اختبار أحمر الميتيل Methyl red Test (MR): (McDevitt, 2009)

كشف هذا الاختبار عن إنتاج البكتريا للأحماض مثل حمض اللاكتيك أو الأسيتيك أو الفورميك أثناء تخمير الغلوكوز مع الحفاظ على رقم هيدروجيني pH= 4.5.

3-3-7-اختبار التنفس Oxidation -Fermentation Test: (Hanson, 2008)

هَدَفَ هذا الاختبار لتحديد طبيعة تنفس البكتيريا (هوائية إجبارياً، لاهوائية اختيارياً).

3-3-8-اختبار استقلاب السكريات (غلوكوز- لاكتوز- مالتوز ببتون آغار): (Alhayali and Al-shakarchi, 2021)

تم إجراء هذا الاختبار للتأكد من قدرة هذه البكتريا على استخدام الغلوكوز أو اللاكتوز أو المالتوز كل على حدة في نموها كمصدر وحيد للكربون.

3-4-العدوى الاصطناعية وتقييم كفاءة العزلات في تشكيل العقد:

جمعت تربة زراعية من مزارع أبي جرش في كلية الهندسة الزراعية وتم تعقيمها في الأوتوكلاف مرتين لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 121 ^{o} س, وتركت لمدة 15 يوم لتستعيد تجانسها ثم وزعت التربة في أصص معقمة (قطر 16سم), تم تعقيم بذور البقوليات بالكحول الإيتيلي 95% لمدة دقيقة والغسل بالماء المقطر المعقم ثم زرعت ضمن الأصص، بمعدل خمسة مكررات لكل نبات و 3 بذور في كل أصيص.

بعد الإنبات، جُددت العزلات البكتيرية، وحضرت معلقات بكتيرية من كـــل منها بعد 48 ســـاعة بتركـــيز (2×10^{8} CFU/ml)، ولقح 1مل من كل معلق ضمن دوارق تحوي 50 مل من وسط مستخلص الخميرة والمانيتول السائل YM, وتم التحضين عند درجة حرارة 28 ^{o} س مع الرج 100 دورة/ دقيقة لمـــدة 48 ساعة, ثم لُقح كل أصيص بـ 12 مل من المعلق البكتيري للعزلة الواحدة (2×10^{8} CFU/ml).

قُلعت النباتات بعد 6-9 أسابيع من الزراعة حسب نوع النبات البقولي وسُجِلَ وجود أو غياب العقد على جذورها.

3-5-الاختبارات الجزيئية باستخدام تقانة Colony-Polymerase chaine reaction (Colony-PCR):

أجري هذا الاختبار للكشف عن إحدى المورثات العامة لدى كل أجناس الريزوبيا وهي مورثة *nodA* (Haukka *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000) وذلك باستخدام شفع بادئات nodA (الجدول 3) و Green master mix (KAPA) .

جدول 3. تتابع النكليوتيدات في البادئ المستخدم للكشف عن مورثة *nodA* عند بكتريا الريزوبيا.

المورثة	التسلسل النكليوتيدي للبادئات	درجة الحرارة Tm	حجم المنتج bp	المرجع
***nodA**	For 5'-TGCRGTGGAARNTRNNCTGGGAAA-3' Rev 5'- GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA-3'	55	666	(Haukka *et al.*, 1998)

*حيث N: A/T/G/C و W: A/T و R: A/G.

أجري تفاعل PCR باستخدام جهاز المدور الحراري (Bio-Gener technology) وفق الشروط المحددة للبادئ (الجدول 4). بعد إتمام المدور الحراري لدوراته (40 دورة) تم الكشف عن نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي بتطبيق تيار 100 فولط على هلامة أغاروز 1% مصبوغة بمحلول Red safe ضمن محلول TBE 1x, بالمقارنة مع سلم جزيئي 100 bp، وتم إظهار الحزم بالتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامات (Cleaver scientific Ltd) Gel- documentation system.

جدول 4. مراحل تفاعل الـ PCR باستخدام البادئ nodA.

المرحلة	تكسير الجدر الخلوية	فصل سلسلتي الدنا	ارتباط البادئات Tm	استطالة السلسلة	استكمال الاستطالة
درجة الحرارة (س°)	94	94	55	72	72
الزمن بالدقيقة	5	1	1	1	10

3-6- العدوى المتصالبة:

أجريت العدوى التصالبية للمحاصيل البقولية الرئيسية (فول، حمص، بازلاء، فول الصويا، فصة) للتأكد من تخصص كل عزلة بكتيرية بمحصول بقولي معين، وذلك بنفس طريقة العدوى الاصطناعية، وخصص لبذور كل نبات بقولي 74 أصيص بمعدل مكررين لكل عزلة (37عزلة)، فكان المجموع النهائي للتجربة 370 أصيص و10 أصص شاهد.

جددت العزلات التي انتمت لمجموعة الريزوبيا اعتماداً على الاختبارات السابقة، وحضر من كل منها معلق بكتيري بتركيز 10^8 CFU/ml و روي كل أصيص 12مل من المعلق. قلعت النباتات بعد 6-8 أسابيع ولوحظ على الجذر ووجود أو غياب العقد.

3-7- البصمة الوراثية:

أجري اختبار البصمة الوراثية rep-PCR بأنواعه الثلاث (ERIC-, REP-, BOX-PCR) على 25 عزلة بكتيرية (R35، R36، R42، R45، R46، R47، R61، R62، R75، R76، R79، R88، R100، R102، R106، R113، R114، R118، R126، R127، R134، R200، R300، RJ23، RK30) (جدول 5)، والتي تم ضمها تصنيفياً إلى مجموعة الريزوبيا بوساطة الاختبارات الكيميائية الحيوية والجزيئية والعدوى الاصطناعية والتصالبية، بهدف تحديد تباينها الوراثي ودرجة قرابتها من بعضها البعض. اعتبرت العزلتان RK30 (معزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص-كفر اللحف-السويداء) و RJ23 (معزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص-جباب-درعا) عزلتان مرجعيتان (الدوس، 2016).

جدول 5. العزلات البكتيرية المستخدمة في اختبار البصمة الوراثية وعوائلها النباتية ومناطق جمعها.

رمز العزلة	النبات البقولي	مكان الجمع	رمز العزلة	النبات البقولي	مكان الجمع
R45	الحمص	ولغا-السويداء	R35	الفول	عدرا-ريف دمشق
R46	الحمص	ولغا-السويداء	R36	الفول	عدرا-ريف دمشق
R47	الحمص	ولغا-السويداء	R42	الفول	قدسيا-ريف دمشق
R61	الحمص	كفر اللحف-السويداء	R106	الفول	عدرا-ريف دمشق
R62	الحمص	كفر اللحف-السويداء	R100	الفول	الكسوة-ريف دمشق
R79	الحمص	قنوات-السويداء	R134	الفول	أبوجرش-ريف دمشق
R88	الحمص	ديمة اللحف-السويداء	R200	فول الصويا	السحل-الرقة
R102	الحمص	ديمة اللحف-السويداء	R300	فول الصويا	السحل-الرقة
RJ23	الحمص	جباب-درعا	R75	الفصة	النبك-ريف دمشق
RK30	الحمص	كفر اللحف-السويداء	R76	الفصة	النبك-ريف دمشق
R113	البازلاء	مركز بحوث حمص-حمص			
R114	البازلاء	مركز بحوث حمص-حمص			
R118	حندقوق	مركز بحوث حمص-حمص			
R126	الحلبة	النبك-ريف دمشق			
R127	النفل	صلخد-السويداء			

3-7-1- استخلاص الدنا DNA من العزلات البكتيرية:

استُخلص DNA من مستعمرات فتية (48 ساعة) باستخدام كيت عزل DNA wizard isolation and purification kit من شركة Promega وفق تعليمات الشركة الصانعة.

حُددت سلامة الـDNA بالترحيل الكهربائي لنواتج الاستخلاص على هلامة الآغاروز 1% المُضاف لها Redsafe بمعدل 5 µl/100 ml ضمن محلول منظم للرحلان 1X TBE (10x TBE= 108 غ Tris base، 55غ boric acid، 9.3غ 1mM EDTA/ 1 ل ماء مقطر).

فُحصت الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) بوساطة جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system (Cleaver scientific Ltd).أُعتبرت عينات الحمض النووي DNA ذات جودة جيدة عند عدم وجود تفكك فيها (Smear).

حُدد تركيز الـ DNA ونقاوته باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول الموجات 260 و280 و230 نانومتر(nm) حيث يعطى تركيز DNA من المعادلة التالية:

[DNA] µg/ml= التخفيف*50*A_{260}nm

ويستدل على التلوث بالبروتينات من حساب A_{260}nm / A_{280}nm ، والتلوث بالسكريات المتعددة من حساب A_{260}nm/ A_{230}nm، وتكون العينة جيدة إذا كانت النسبة بين 1.8- 2 .

حضرت تمديدات من عزلات الـ DNA بتركيز نهائي 10 نانوغرام / ميكروليتر لاستخدامه في تفاعلات rep- PCR.

3-7-2- تفاعل البصمة الوراثية Repetitive element palindromic (rep-PCR):

أُجريت تفاعلات(REP-PCR، ERIC-PCR، BOX-PCR) المعتمدة على السلاسل التكرارية الموجودة ضمن الجينوم البكتيري للعزلات البكتيرية المدروسة، وذلك بتنفيذ تفاعل الـ PCR ، الذي يتكون من 12.5 µl hot start gotaq Master Mix 2x (promega) و 1.25 µl من البادئ المباشر For (10 pmol)

و1.25 µl من البادئ غير المباشر Rev (10 pmol) وذلك في تقانتي الـ Rep و Eric أما في تقانة الـ Boxتم استخدام 2. 5 µl (25 pmol) من البادئ Box1AR الذي يتميز بوجود متمم له على كلا سلسلتي الدنا(جدول 6)، و5 µl من محلول DNA و5 µl ماء مقطر معقم لإكمال حجم التفاعل النهائي إلى 25 µl. أُجري تفاعل الـ PCR للتقانات الثلاث باستخدام جهاز المدور الحراري (Bio-Gener technology) وفق المراحل التالية : مرحلة تنشيط الأنزيم وفصل سلسلتي الـDNA ولمدة زمنية 7 دقائق لدورة واحدة تليها مرحلة مكررة لـ 35(denaturation لمدة 1دقيقة، alignment حسب Tm كل شفع بادئات (جدول 6) لمدة 1دقيقة وبلمرة polymerization لمدة 4 دقائق ثم مرحلة استطالة final extention لدورة واحدة ومدة زمنية 10 دقيقة.

جدول 6. تتابع النكليوتيدات في بادئات البصمة الوراثية PCR (Rep-, ERIC-, BOX-).

الغاية	الجزء الهدف	التسلسل النكليوتيدي للبادئات	درجة الحرارة Tm سْ	المرجع
بادئات البصمة الوراثية	REP	REP1R-I 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3' REP2-I 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'	55	(Wieser *et al.*, 2000)
	ERIC	ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	52	
	BOX	BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	53	

بعد إتمام الـ PCR لدوراته تم الكشف عن نواتج التفاعل على هلامة أغاروز 1.5% صبغت بصبغة Redsafe وضمن محلول TBE، بالمقارنة مع مؤشر جزيئي 1kb (Thermo scientific #SM0314) ومؤشر جزيئي 100 pb (Thermo scientific #SM0314) وتطبيق تيار كهربائي 90 فولط لمدة

ساعتين، ثم إظهار الحزم بالتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system (Bio-Gener technology) سُجلت نتائج الرحلان بتحديد الأوزان الجزيئية للحزم الناتجة من التضخيم بتقانة rep- PCR. من خلال مقارنتها مع المؤشرات الجزيئية المستخدمة.

حُدد وجود أو غياب الحزم وفق النظام الثنائي (0.1) وحُددت مصفوفة التشابه والتباعد الوراثي بين العزلات المدروسة بكل تقانات rep- PCR حسب Nei (1978) باستخدام برنامج population genetic analysis POPGEN version 1.32، ورسمت شجرة القرابة الوراثية بطريقة UPEGMA بالاعتماد على معادلة Nei و Li (1979) في حساب معامل التباعد وأظهرت الـ Bootstrap على أفرع الشجرة (iteration 1000 مرة).

3-8- اختبار قدرة البكتيريا المعزولة على تثبيط نمو مسبب ذبول فوزاريوم على الحمص:

3-8-1-العزلات الفطرية

تم الحصول على عزلتين فطريتين (F51 - F63) (شرسة - متوسطة الشراسة على التوالي) معزولتين ومعرفتين محلياً على أنهما *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* من قبل د. ميساء علوش-جامعة البعث (علوش، 2018). جددت العزلتين وعديت 3 أصص بكل عزلة، وذلك بتلويث التربة المعقمة بقطع من مشيجة الفطر ثم زراعة 3 بذور من الحمص في كل أصيص، بعد 8 أسابيع من إنبات البذور قلعت النباتات التي ظهرت عليها أعراض المرض وأعيد عزل الفطر الممرض منها لضمان حفاظ العزلات الفطرية على شراستها.

3-8-2-العزلات البكتيرية

استخدمت 61 عزلة بكتيرية معزولة من العقد الجذرية للنباتات البقولية (فول، حمص، بازلاء، حندقوق، فصة، نفل، فول الصويا، بيقية، عدس) المجموعة من عدة محافظات سورية (ريف دمشق، درعا، السويداء، حمص،

حماة، اللاذقية، الرقة)، منها 42 عزلة معرفة على أنها تنتمي لمجموعة الريزوبيا (*Mesorhizobium* و*Rhizobium* و *Bradyrhizobium* و *Ensifer*) ، و19 عزلة من البكتريا الجذرية غير معرفة.

3-8-3-اختبار قدرة العزلات البكتيرية على تثبيط نمو الفطر الممرض مخبرياً باستخدام طريقة القطاعات:

نميت العزلات الفطرية (F51، F63) على وسط Potato Dextrose Agar (PDA)، وحضنت عند درجة حرارة 25 ºس لمدة سبعة أيام لغاية ملء الطبق بالنمو الفطري.

نشرت العزلات البكتيرية (61 عزلة) على أطباق من وسط Yeast Manitol Agar (YMA) على شكل مستعمرات مفردة وحضنت عند درجة حرارة 28 ºس لمدة 48 ساعة.

حضر وسط مغذي يسمح بنمو الفطر والبكتريا المدروسين معاً مكون من YMA و PDA بنسبة 1:1 حجماً وعقم في الأوتوكلاف عند درجة حرارة 121 ° س لمدة 20 دقيقة، ثم وزع ضمن أطباق بتري بقياس 9 سم. وضع في مركز كل طبق بتري قرص من المشيجة الفطرية بقطر 1 سم، و وزعت على محيطه 4 عزلات بكتيرية مختلفة بشكل خط مستقيم على بعد 1 سم من حافـة الطبق وبمعـدل 3 مكـررات لكل عزلة بكتيرية، وتركت ثلاثة أطباق كشاهد لكل عزلة فطرية بدون تلقيح بالبكتريا. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28 °س وبعد 96 ساعة من التحضين سجل نصف قطر نمو الفطر الشاهد ونصف قطر نمو فطر المعاملة، وحسبت نسبة التثبيط للنمو الفطري باستخدام المعادلة:

نسبة التثبيط Inhibition (%) = [(نصف قطر مستعمرة الفطر الشاهد – نصف قطر مستعمرة الفطر المعاملة) / نصف قطر مستعمرة الفطر الشاهد] × 100

أُنتخبت أفضل عزلة بكتيرية، من حيث قدرتها على تثبيط نمو الفطر في الزجاج لاختبار قدرتها في تثبيط الفطر الممرض في تجربة ضمن الأصص.

3-8-4-اختبار قدرة العزلات البكتيرية على الحد من الإصابة بذبول فوزاريوم وتحسين نمو النبات باستخدام العدوى الاصطناعية ضمن الأصص:

عقمت تربة زراعية لمدة ساعة في الاتوكلاف عند درجة حرارة 121 °س وتركت 15 يوم لتستعيد خواصها الأساسية، ثم وزعت التربة على 75 أصيص (قطر 16سم).

انتخبت إحدى أفضل العزلات البكتيرية الريزوبية التي أظهرت أعلى قدرة تضادية مخبرياً(عزلة على نبات الحمص 61) وحضرت منها معلقات بكتيرية كل على حدة بتركيز 10^8 CFU/ml، أعديت التربة في أصص المعاملات بالمشيجة الفطرية للعزلتين F63 و F51 كل على حدة وسقيت بعضها بمعلقات بكتيرية للعزلة المنتخبة، وأبقيت أصص بدون معاملة كشاهد وبعضها معاملة بالفطر فقط والبعض الآخر معاملة بالبكتريا فقط. ثم عقمت بذور الحمص (صنف بلدي) ووزعت في الأصص بمعدل 4 بذور في الأصيص تبعا للتصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) (جدول 7).

جدول7 . التضاد بين العزلة البكتيرية (61) والعزلتين الفطريتين (F63، F51) على نبات الحمص ضمن الأصص *.

معدى بالفطر	ملقح بالبكتريا	بكتريا× فطر	شاهد
معدى بالفطر F63 معدى بالفطر F51	ملقح بالعزلة 61	F63×61 F51×61	غير معدى بالفطر وغير ملقح بالبكتيريا

*. 3 مكررات لكل معاملة

بعد 9 أسابيع من الزراعة حُسبت شدة المرض وفق السلم المعتمد ونسبة الإصابة ثم قلعت النباتات وأخذت أطوال المجموع الجذري والمجموع الخضري وأوزانها. تم تقييم المرض على مقياس شدة 0-4 اعتماداً النسبة المئوية للنسيج الورقي المصاب بالاصفرار أو الذبول (Abdel-Monaim *et al.*, 2018; Liu *et al.* :1995)

0 - 0%

1 - 1-33%

2 - 34-66%

3 - 67-100%

4- جفاف النبات وموته.

حُسبت النسبة المئوية لشدة المرض بالمعادلة: $\Sigma d/(d\ max \times n) \times 100$ = شدة المرض Disease Severity Index(%)

حيث d هو درجة الإصابة لكل نبات، و d max هو أعلى درجة على سلم الإصابة، و n هو عدد النباتات في كل معاملة.

كما حسبت النسبة المئوية للإصابة على النباتات وفقاً للمعادلة (علوش وآخرون، 2015)

نسبة الإصابة Infection Rate (%) = عدد النباتات المصابة/عدد النباتات في التجربة ×100

التحليل الاحصائي: حللت النتائج الدراسة إحصائياً بطريقة تحليل التباين ANOVA، وباستخدام برنامج Genstat الإصدار 12. ثم قورنت المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) عند مستوى معنوية 5% للتجارب ضمن الأصص و1% للتجارب المخبرية، واختبار دنكن متعدد الحدود Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

3-9- أمثلة شروط إنتاج السماد الحيوي:

3-9-1- العزلة البكتيرية:

بالاعتماد على نتائج التعريف والتضاد المخبري تم انتخاب إحدى أفضل العزلات الريزوبية (R134). جددت العزلة وحضر منها معلق بكتيري بتركيز 10^8 CFU/ml.

حضر وسط مغذي سائل من مستخلص الخميرة والمانيتول Yeast Mannitol (YM) وصب في 4 دوارق بسعة 1 ليتر، عقمت الدوارق في الأوتوغلاف عند درجة حرارة 121°س. لقح 200µl من المعلق البكتيري المحضر سابقاً بتركيز 10^8 CFU/ml ضمن 3 دوارق وترك دورق بدون تلقيح كشاهد، وحُضنت الدوارق لمدة 48 ساعة عند درجة 28 °س ضمن الحاضنة الهزازة عند سرعة 100 دورة/دقيقة.

3-9-2- المواد الحاملة:

استخدمت ثلاثة أنواع من المواد الحاملة وهي التربة المنخولة، والبيرلايت، والتورب لدراسة أيها أفضل كمادة حاملة للقاح البكتيري وتم التحضين عند درجتي حرارة (25 و 4 °س) واستمرت التجربة لمدة 5 أشهر لتقييم أي حرارة أفضل لتخزين اللقاح وأي زمن من فترة التخزين هو الأفضل لاستخدام هذا اللقاح حقلياً. أخضعت المواد الحاملة للمراحل التالية:

أ-قياس درجة حموضة pH المواد الحاملة (Pal, 2006):

تم قياس درجة حموضة المواد الحاملة المستخدمة في التجربة بوزن 10 غ من كل منها ووضعها في بيشر وإضافة 25 مل من الماء المقطر، خلط المزيج لمدة 10 ثواني باستخدام قضيب زجاجي وقيس pH باستخدام جهاز قياس الـ pH (HANNA:HI2211).

ب-قياس رطوبة المواد الحاملة (Craze, 1990; Black, 1965):

تم قياس الرطوبة بوضع ورقة قصدير على الميزان الرقمي وتصفير الجهاز ثم إضافة حوالي 30 غ من التربة ووزنها وتسجيل الرقم تحت مسمى w1، توضع عينة التربة في الفرن لتجف عند درجة 105 °س لمدة 24 ساعة، ثم تركت لتبرد ووزنت بنفس الطريقة السابقة وسجل الرقم w2 . طبقت المعادلة التالية لحساب النسبة المئوية للرطوبة:

$$\frac{W1-W2}{W2}=\text{WC\%}$$

حيث: W1 الوزن الرطب للعينة و W2: الوزن الرطب للعينة

ج–تجهيز المادة الحاملة:

جمعت تربة زراعية من منطقة مزارع أبو جرش على عمق 0–30 سم، ونخلت وعبئت في 8 أوعية زجاجية متحملة للحرارة ومحكمة الإغلاق، كما تم تعبئة 8 أوعية أخرى بمادة البيرلايت و 8 أوعية بالتورب. أُغلقت الأوعية بإحكام وعقمت في الأوتوغلاف عند درجة حرارة 121 ْس لمدة ساعة.

تركت الأوعية لتستعيد المواد تركيبها الفيزيائي لمدة 5 أيام ومن ثم لقح 6 أوعية من كل معاملة بـ 100مل من المعلق البكتيري (10^7 CFU/ml) وترك مرطبانين كشاهد لقحا فقط بوسط مغذي سائل من مستخلص الخميرة و المانيتول YM. خلطت محتويات كل مرطبان لضمان توزع اللقاح بشكل جيد باستخدام قضيب زجاجي معقم وأحكم إغلاقها.

حضن نصف عدد الأوعية لكل معاملة (4 أوعية) عند درجة حرارة المختبر 25 ْس والنصف الآخر (4 أوعية) عند درجة حرارة 4 ْس . أخذ 1غ من كل معاملة بعد ساعة من التلقيح وحضرت 4 تخفيفات (1/10 ، 1/100، 1/1000 ، 1/10000) ثم زرع 30 µl من آخر تركيز على 3 أطباق من وسط YMA، حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28 ْس وبعد 48 ساعة تم عد المستعمرات النامية على الطبق وحسب التركيز البكتيري في 1 مل من المستحضر. كما أخذت عينات بنفس الطريقة السابقة من كل معاملة بعدة

أزمنة من بدء التلقيح (24 ساعة، 48سا، 72سا، 96سا، 15يوم، 30يوم، 60يوم، 90يوم، 120يوم، 150يوم).

سجلت القراءات وحللت النتائج الدراسة إحصائياً بطريقة تحليل التباين ANOVA، وباستخدام برنامج Genstat الإصدار 12. وقورنت المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) عند مستوى معنوية 1% ، واختبار دنكن متعدد الحدود Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

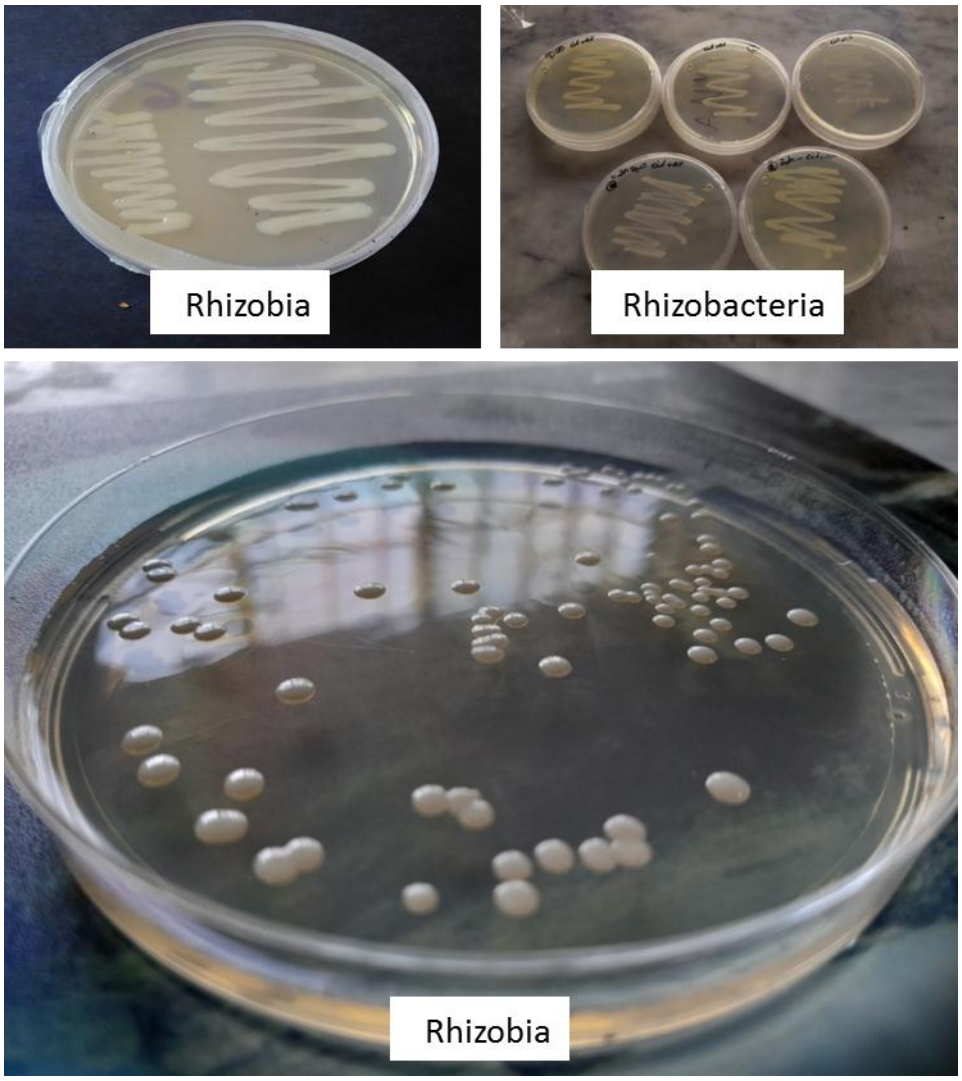
الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4-1-عزل البكتريا وتعريفها:

تم عزل 109 عزلات بكتيرية (الشكل4) من العقد الجذرية لأحد عشر نبات بقولي موضحة في الجدول (8) حسب منطقة الجمع.



الشكل 4. المستعمرات البكتيرية لبكتريا Rhizobia و Rhizobacteria على وسط Yeast Mannitol Agar (YMA).

جدول 8. التوزع الجغرافي للعزلات البكتيرية والعائل النباتي.

النبات البقولي	رمز العزلة	منطقة الجمع	المحافظة
فول *Vicia faba*	R_{44}–R_{43}–R_{42}–R_{41}–R_{40}–R_{39}	قدسيا	ريف دمشق
	R_{111}–R_{110}–R_{109}–R_{108}–R_{107}–R_{106}–R_{38}–R_{37}–R_{36}–R_{35}	عدرا	
	R_{66}–R_{65}–R_{64}	النشابية	
	R_{101}–R_{100}	الكسوة	
	R_{134}– R_{134B}–R_{133}	أبوجرش	
	R_{86}–R_{85}–R_{84}–R_{83}	كفربطنا	
فصة *Medicago sativa*	R_{76}–R_{75}–R_{74}–R_{73}–R_{72}	النبك	
	R_{96}–R_{95}–R_{94}–R_{93}	ابوجرش	
بازلاء *Pisum sativum*	R_{136}–R_{135}	أبوجرش	
عدس *Lens culinaris*	R_{130}–R_{129}	أبوجرش	
حلبة *Trigonella foenum-graecum*	R_{126}–R_{121}–R_{120}–R_{119}	النبك	
حندقوق *Melilotus indicus*	R_{60}–R_{59}–R_{58}–R_{57}–R_{56}–R_{55}–R_{54}–R_{53}–R_{52}	أبوجرش	
حمص *Cicer arietinum*	R_{51}–R_{50}–R_{49}–R_{48}	جباب	درعا
حمص *Cicer arietinum*	R_{47}–R_{46}–R_{45}–R_{45}	ولغا	السويداء
	R_{63}–R_{62}–R_{61}	كفراللحف	
	R_{81}–R_{80}–R_{79}–R_{78}–R_{77}	القنوات	
	R_{92}–R_{91}–R_{90}–R_{89}–R_{88}–R_{87}	صلخد	
	R_{105}–R_{104}–R_{103}–R_{102}	ديمة اللحف	
فول *Vicia faba*	R_{71}–R_{70}–R_{69}–R_{68}–R_{67}	كفراللحف	
فصة *Medicago sativa*	R_{99}–R_{98}	كفر اللحف	
بيقية *Vicia sp.*	R_{150}	عرمان	

	R_{132}–R_{131}	صلخد	
قتاد *Astragalus mollis*	R_{125}–R_{124}–R_{123}–R_{122}	صلخد	
النفل/برسيم *Trifolium pratense*	R_{128}–R_{127}	صلخد	
فول *Vicia faba*	R_{97}	بتمانا	اللاذقية
	R_{139}–R_{138}	زغرين	
حمص *Cicer arietinum*	R_{117}	مركز بحوث حمص–الدوير	
عدس *Lens culinaris*	R_{116}–R_{115}	مركز بحوث حمص–الدوير	
بازلاء *Pisum sativum*	R_{114}–R_{113}–R_{112}	مركز بحوث حمص–الدوير	حمص
حندقوق *Melilotus indicus*	R_{118}	مركز بحوث حمص–الدوير	
فول *Vicia faba*	R_{141}	ريف السلمية	حماة
فول الصويا *Glycine max*	R_{300}–R_{200}	السحل	الرقة

4-1-1-تعريف البكتريا باستخدام الطرائق الكيميائية الحيوية:

أظهرت نتائج العزل على الوسط الانتخابي YMA مع أحمر الكونغو بعد 48 ساعة من التحضين، مستعمرات بكتيرية ذات لون كريمي وردي باهت، ودائرية الشكل، وتامة الحواف، ومخاطية، باستثناء 5 عزلات (138، 139، 52، 60، 78) ظهرت بلون أحمر باهت على وسط الزرع واستبعدت من الدراسة نظراً لأن البكتريا التي لاتنتمي لجنس الريزوبيا تمتص صبغة الكونغو من الوسط وتظهر مستعمراتها بلون أحمر أو وردي غامق أو أحمر باهت (Astuti and Mulyono, 2021).

وعند إجراء اختبار غرام المعتمد على مزج جزء من المستعمرة البكتيرية مع قطرة من محلول KOH 3% لوحظ أن 61 عزلة سالبة الغرام بينما كانت 43 عزلة موجبة الغرام وتم استبعادها من بقية الاختبارات باعتبار بكتريا الريزوبيا سالبة الغرام (Astuti and Mulyono, 2021).

تميزت جميع العزلات بأنها موجبة لاختبار الكاتالاز والأكسيداز و Bromothymol Blue (BTB) واستقلاب السكريات (غلوكوز، لاكتوز، مالتوز)، وسلبية لاختبار Methyl Red ، باستثناء العزلات (54-77-81-86-90-91-92-93-95-97-108-116-117-119-131-133-136-141-150) فقد كانت موجبة لاختبار MR وسالبة لاختبار الأوكسيداز. وكان معظم العزلات هوائية لاهوائية بينما تباينت نتائجها بالنسبة لاختبار تحلل النشاء والجيلاتين وهذا يتوافق مع الدراسات المرجعية التي أظهرت تباينات كبيرة في نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية حيث أظهرت دراسة للباحثين Wubie و Adal (2021) على ريزوبيا الحمص أن 91% من العزلات حللت الجيلاتين و 78% حللت النشاء و 91% حللت الاكتوز والسكروز وجميع العزلات حللت سكريات المالتوز والغلوكوز، بينما ذكر Oryakhil و Irfan (2020) أن عزلات الريزوبيا المعزولة من الحمص لم تحلل الجيلاتين وتباينت في قدرتها على استقلاب النشاء. أما الريزوبيا المعزولة من العقد الجذرية للبازلاء فقد حللت نسبة 12% فقط من العزلات الجيلاتين (Deshwal and Chaubey, 2014).

على الرغم من تباين النتائج السابقة ولكن يعد التوصيف الكيميائي الحيوي للسلالات الجديدة أمر مهم لأنه يوفر معلومات عن هذه السلالات ويساعد في تحديدها السريع والصحيح، وبغض النظر عن دقة هذه الاختبارات لكنها تساعد في اختبار العزلة المثالية والأفضل اقتصادياً وزراعياً عند استخدامها كمخصب حيوي نظراً لأن هذه الاختبارات تعطي أيضاً معلومات عن درجات الحرارة والأس الهيدروجيني المناسب لنمو كل سلالة وبالتالي اختيار السلالة الأمثل للتربة والمناخ (Nakei *et al.*, 2022).

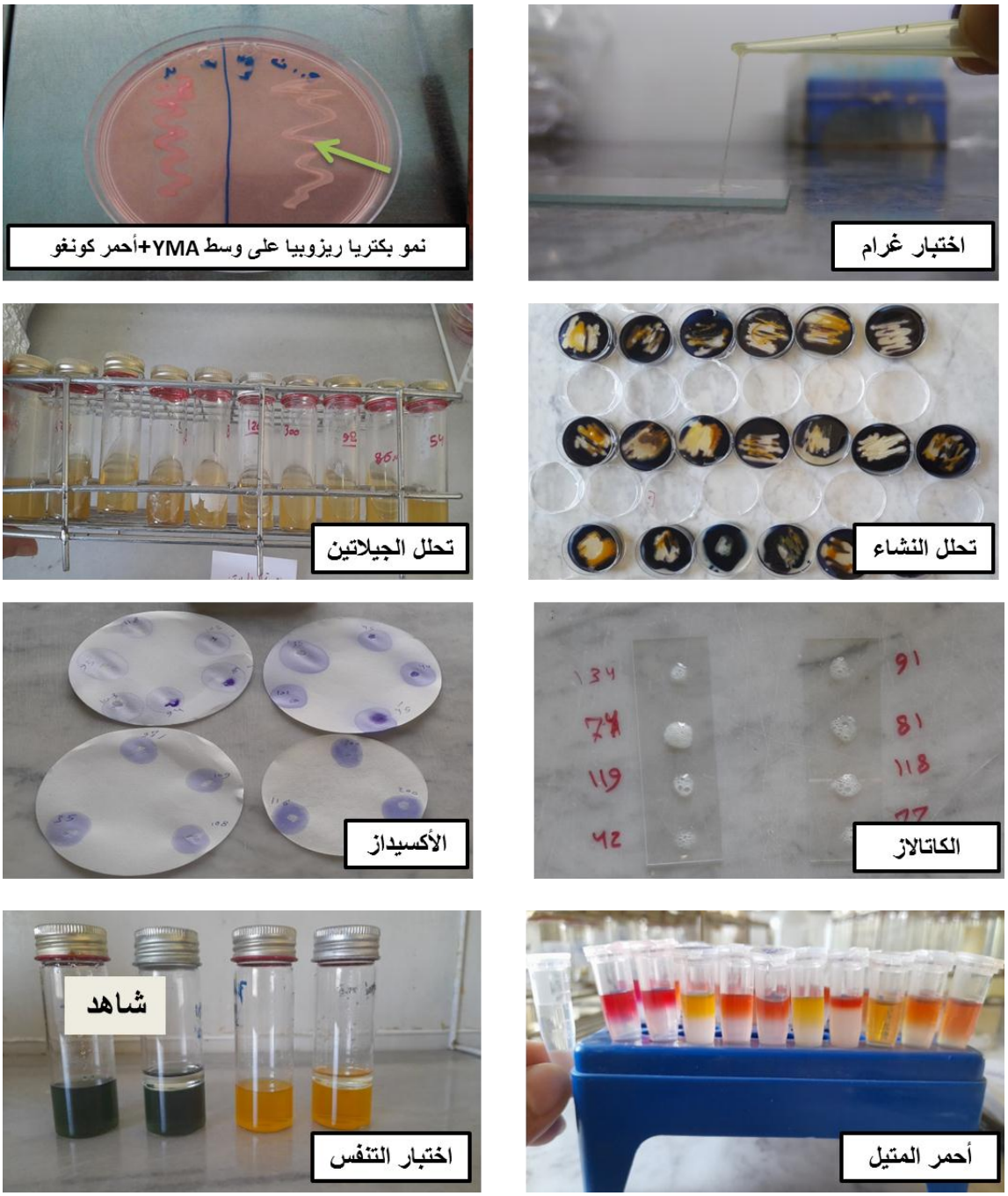
تشير نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية إلى أن العزلات (54-77-81-86-90-91-92-93-95-97-108-116-117-119-131-133-136-141-150) من الممكن ألا تنتمي للريزوبيا نظراً

لاختلاف نتائج اختباراتها مع الصفات المرجعية لهذه البكتيريا التي تؤكد أن بكتريا الريزوبيا إيجابية لاختبار الأوكسيداز وسلبية لاختبار MR (Hossain *et al.*, 2019).

جدول 9. الخصائص الكيميائية الحيوية للعزلات البكتيرية.

رمز العزلة	تحلل النشاء	Methyl red	تحلل الجيلاتين	أوكسيداز	التنفس	
					هوائي	لاهوائي
35	+	-	+	+	+	-
36	+	-	-	+	+	-
38	-	-	+	+	+	-
40	-	-	+	+	+	+
42	-	-	-	+	+	+
43	-	-	-	+	+	-
44	-	-	+	+	+	+
45	+	-	+	+	+	-
45'	-	-	+	+	+	+
46	-	-	+	+	+	+
47	+	-	+	+	+	+
54	-	+	-	-	+	-
61	-	-	+	+	+	+
62	+	-	-	+	+	+
69	+	-	-	+	+	-
72	-	-	+	+	+	-
73	-	-	+	+	+	+
74	+	-	+	+	+	+
75	+	-	+	+	+	-
76	-	-	+	+	+	+
77	+	+	+	-	+	-
79	+	-	+	+	+	+
81	+	-	+	+	+	+
83	-	-	+	+	+	+
84	-	-	+	+	+	-
86	+	+	+	-	+	+
88	-	-	+	+	+	-
90	-	+	+	-	+	+
91	+	+	-	-	+	+
92	+	+	+	-	+	+
93	+	+	+	-	+	+
94	+	-	+	+	+	+
95	+	+	+	-	+	+
97	+	+	+	-	+	+
98	-	-	+	+	+	+
99	+	-	+	+	+	+
100	+	-	+	+	+	+
102	-	-	+	+	+	+

103	+	-	+	+	+	+
108	+	+	-	+	+	+
109	+	-	+	+	+	+
110	+	-	+	+	+	+
113	-	-	+	+	+	-
114	-	-	+	+	+	-
116	+	+	+	-	+	+
117	+	+	+	-	+	+
118	+	-	+	+	+	+
119	+	+	-	-	+	+
126	+	-	+	+	+	-
127	-	-	+	+	+	-
128	+	-	+	+	+	+
131	+	-	+	-	+	-
132	+	-	+	+	+	+
133	+	+	+	-	+	+
134	+	-	+	+	+	+
135	+	-	+	+	+	+
136	+	+	-	+	+	+
141	+	+	-	-	+	+
150	+	+	-	-	+	+
200	+	-	+	+	+	+
300	+	-	+	+	+	+



الشكل 5.الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلات البكتيرية.

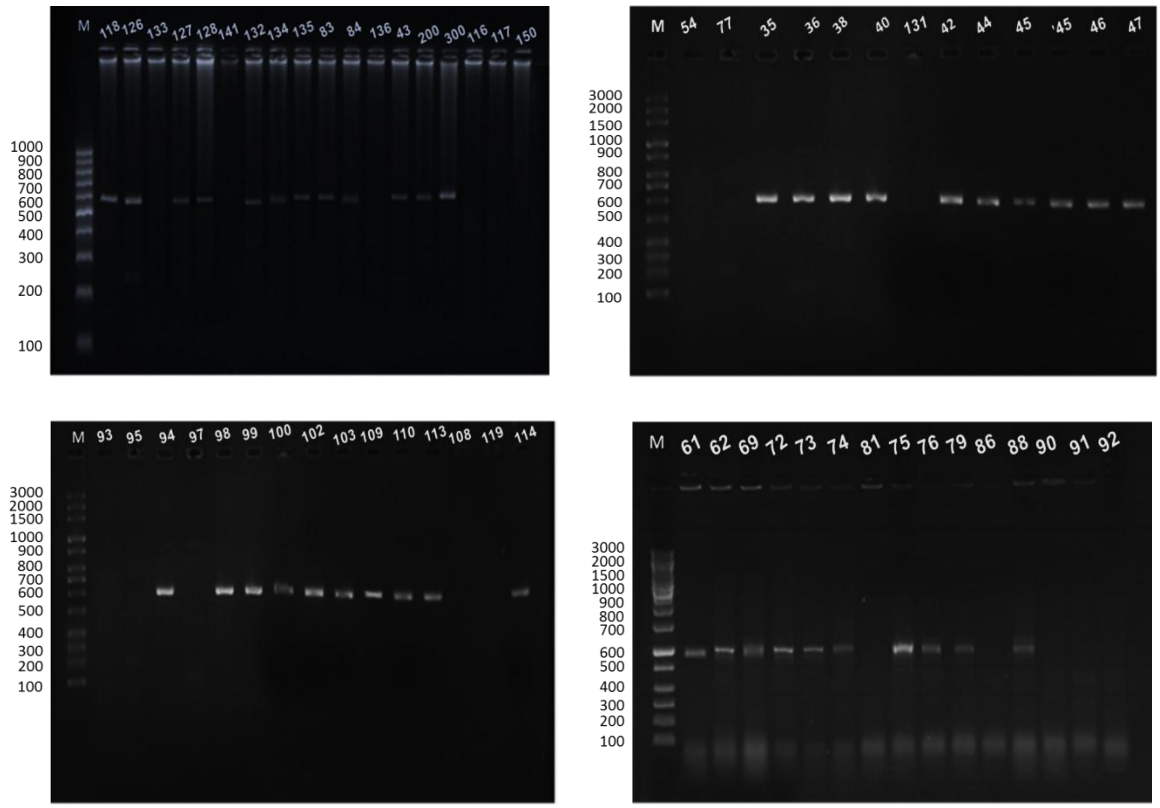
4-1-2- العدوى الاصطناعية وتقييم كفاءة العزلات في تشكيل العقد:

أظهرت نتيجة العدوى الاصطناعية باستخدام العزلات المدرجة في الجدول (9) على نباتات الفول، والحمص، والبازلاء، والحندقوق، والفصة، والنفل، وفول الصويا، والبيقية، والعدس، أن 42 عزلة شكلت عقداً جذرية على النباتات البقولية، كل عزلة حسب النبات الذي عزلت منه باستثناء العزلات (54-77-81-86-90-91-

92-93-95-97-108-116-117-119-131-133-136-141-150) لم تشكل أي عقد جذرية وهذا يضيف سبباً آخر لاعتبار هذه العزلات ليست من بكتريا الريزوبيا لعدم قدرتها على تشكيل العقد على جذور النباتات التي عزلت منها وهذا يتوافق مع Alhayali و Alshakarchi (2021).

4-1-3-التعريف باستخدام تقانة Colony-pcr:

أجري اختبار colony-pcr لـ 61 عزلة المدرجة في الجدول (9)، فأظهرت النتائج أن العزلات (54-77-81-86-90-91-92-93-95-97-108-116-117-119-131-133-136-141-150) التي لم تشكل عقد جذرية لم تعط أي حزمة أيضاً بينما أظهرت بقية العزلات حزمة بحجم 666 bp، وهذا يدعم تصنيف العزلات التي أعطت الحزمة على أنها ريزوبيا باعتبار هذه المورثة (*nodA*) عامة وموجودة لدى كل أجناس الريزوبيا وهذا ما أشار إليه Zhang وآخرون (2000) وكذلك Igolkina وآخرون (2019).



الشكل 6. الرحلان الكهربائي لنواتج PCR على هلامة الأغاروز 1% باستخدام زوج البادئات nodA.

توافقت نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية مع العدوى الاصطناعية والاختبارات الجزيئية، وبينت الدراسة أن 42 عزلة تنتمي لأجناس الريزوبيا: 15 عزلة من جذور نبات الفول، و10 عزلات من العقد الجذرية للحمـص، و8 عزلات من العقد الجذرية للفصة، وعزلتان من العقد الجذرية لفول الصويا، وعزلتان من العقد الجذرية للنفل، وعزلتان من العقد الجذرية للبازلاء، وعزلة واحدة من العقد الجذرية للبيقية، وعزلة واحدة من العقد الجذرية للحلبة، وعزلة واحدة من العقد الجذرية للحندقوق، بينما 19 عزلة عزلت من العقد الجذرية للبقوليات ولاتنتمي للريزوبيا.

4-2- العدوى المتصالبية:

أدى تلقيح العزلات المعزولة من كل نبات على النباتات الأخرى إلى ظهور العقد الجذرية على النبات الذي عزلت منه العزلة فقط دون النباتات الأخرى، وبالمقارنة مع الدراسات المتعلقة بكل نوع بقولي، ذكر Chen وآخرون (2018) أن 41 عزلة من إجمالي 65 معزولة من جذور نبات الفول في الصين انتمت لجنس *Rhizobium* و النوع *R. anhuiens*، بينما أشار Rahi وآخرون (2020) إلى أن عزلات الريزوبيا المعزولة من جذور نبات البازلاء تقاربت وراثياً من الجنس *Rhizobium* ، كما لاحظ Gunnabo وآخرون (2021) أن العزلات الرايزوبية المعزولة من عقد نبات الحمص في إثيوبيا انقسمت إلى عدة أنواع جميعها ينتمي إلى الجنس *Mesorhizobium*، وعندما درس الباحثان Badri و Ludidi (2023) التنوع الوراثي لبكتريا الريزوبيا المرافقة لنبات الفصة لاحظا أنها تتبع النوعين *Ensifer meliloti* و *E. medicae*.

أشار Nakei وآخرون (2022) حديثاً إلى أن البكتريا المتعايشة مع جذور فول الصويا تتبع عدة أجناس بعضها بطيء النمو مثل *Bradyrhizobium* وبعضها سريع النمو *Sinorhizobium* و *Rhizobium* و*Mesorhizobium* إلا أن أكثر الأنواع انتشاراً حسب Van Berkum وآخرون (2012) هو النوع B. *japonicum* و *B. elkanii*.

نتيجة لماسبق يمكن تقسيم العزلات في هذا البحث إلى: عزلات تنتمي إلى جنس *Mesorhizobium* معزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص، عزلات تنتمي إلى جنس *Rhizobium* معزولة من العقد الجذرية لنبات

الفول والبازلاء، وعزلات تنتمي إلى جنس *Ensifer* المعزولة من العقد الجذرية لنبات الفصة، وعزلات تنتمي إلى جنس *Bradyrhizobium* المعزولة من العقد الجذرية لنبات فول الصويا، وذلك بالاعتماد على أن كل نوع أو سلالة بكتيرية من الريزوبيا تصيب نبات بقولي معين، وأحياناً يتعايش النوع الريزوبي مع محصولين بقوليين (Checcucci *et al.,* 2019; Walker *et al.*, 2020)، وعُزز هذا التصنيف بالاعتماد على نتائج البصمة الوراثية وتوزع العزلات ضمن شجرة القرابة الوراثية (الشكل 8).

4-3- التباين الوراثي لعزلات الريزوبيا:

بعد إجراء اختبار البصمة الوراثية بأنواعها الثلاث (ERIC-, REP-, BOX-PCR)، استبعدت ست عزلات (R35، R36، R42، R46، R100، R106) لعدم ظهور نتيجة على الهلامة، بسبب تحلل الدنا خلال فترة الحفظ.

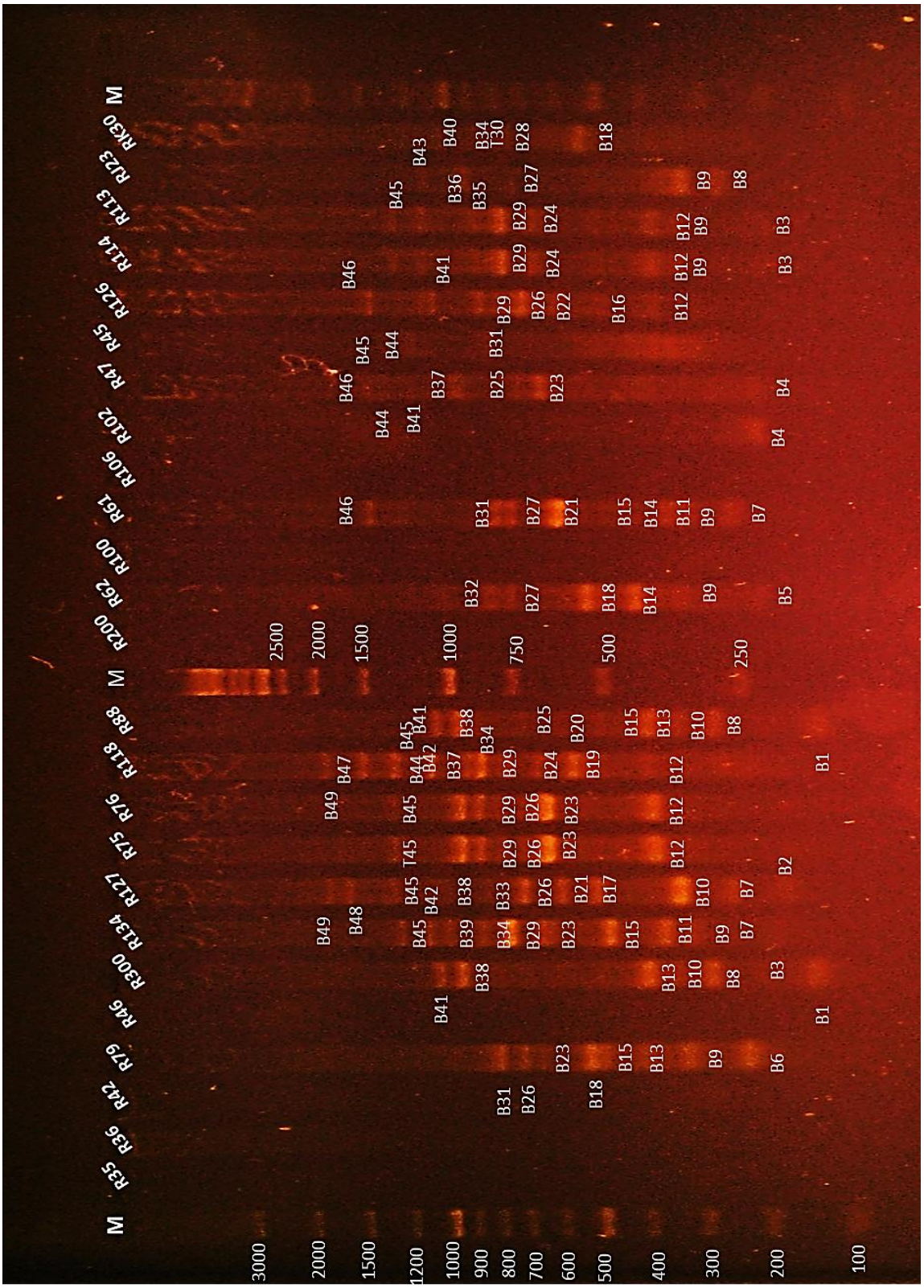
أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تقانات rep-PCR وجود 167 حزمة مميزة توزعت لـ (49، 47، 70) لتقانات BOX-PCR (الشكل 7.A)، وERIC-PCR (الشكل 7.B)، وREP-PCR (الشكل 7.C) على التوالي.

أظهرت العزلات تنوع وراثي عند استخدام تقانة الـBOX-PCR حيث كانت الحزم الناتجة polymorphic (وهي الحزم التي كانت موجودة لدى بعض العزلات وأخذت الرمز 1 وغابت في عزلات أخرى وأخذت الرمز 0) وكانت الحزم b2 وb17 و b33 و b48 مميزة للعزلة R127، والحزم b5 و b32 للعزلة R62، والحزم b6 للعزلة R79، والحزم b16 و b22 للعزلة R126، والحزم b19 و b47 للعزلة R118، والحزم b20 للعزلة R88، والحزم b28 و b30 و b40 للعزلة RK30، والحزم b36 للعزلة RJ23، والحزم b39 للعزلة R134. بينما لم تظهر أي حزمة للعزلة R200 في هذا الاختبار وتراوحت الأوزان الجزيئية التقريبية للحزم حسب المؤشر الجزيئي تقريباً بين 150 bp (الحزمةb1) و 2000 bp (الحزمة b49) (الشكل 7.A).

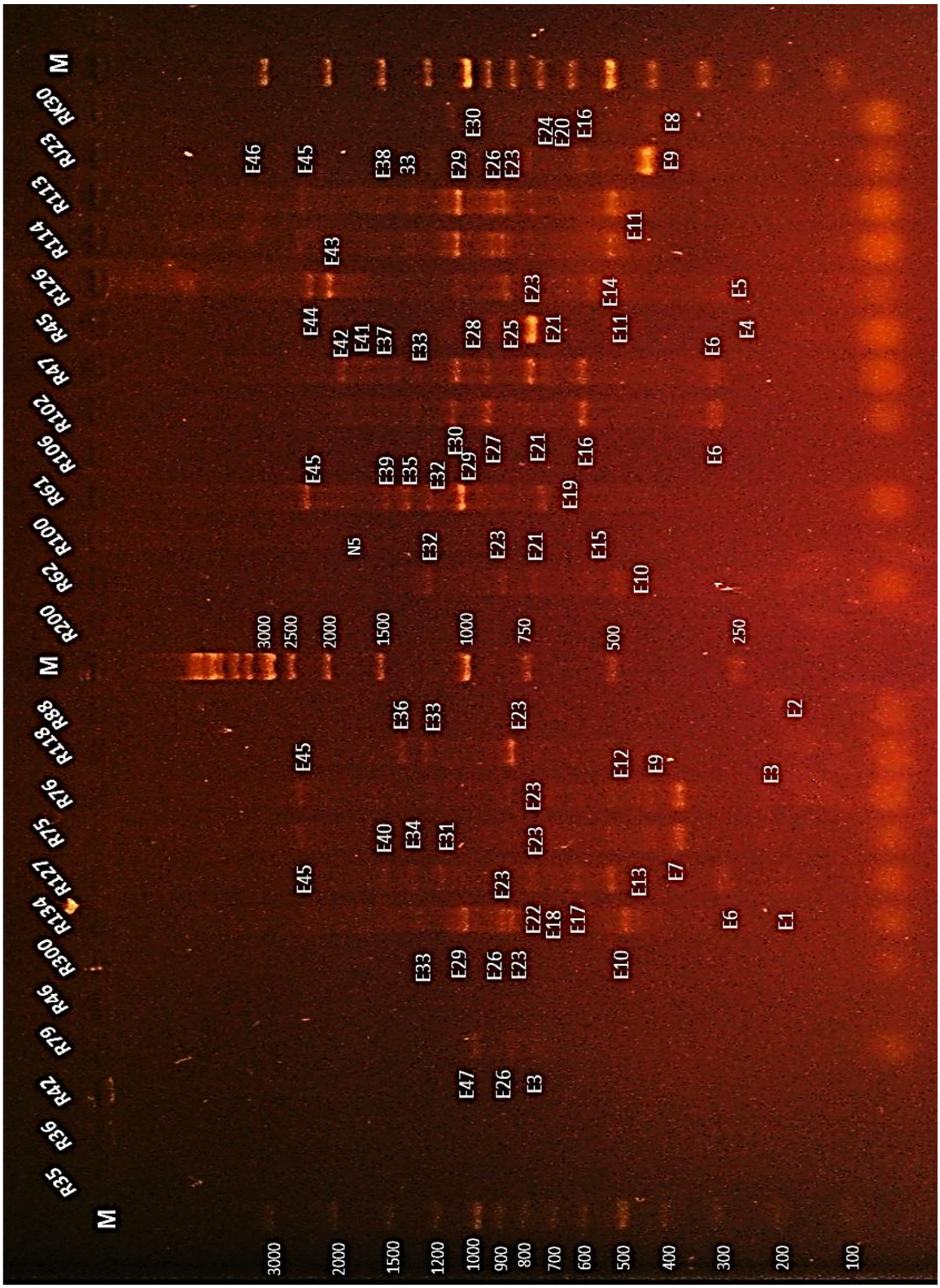
بالنسبة لتقانة ERIC-PCR كانت جميع الحزم الناتجة 47 polymorphic وكانت الحزمة E1 و E13 وE17 و E18 و E22 و E31 و E34 و E40 مميزة للعزلة R127، والحزم E2 للعزلة R88، والحزمة E4 و E25 للعزلة R45، و الحزم E5 و E43 و E44 للعزلة R126، و الحزم E8 للعزلة RK30، والحزم E15 للعزلة R62، والحزم E19 و E35 و E39 للعزلة R61، والحزمة E24 للعزلة RJ23، والحزمة E25 للعزلة R45، والحزمة E36 للعزلة R118، والحزم E41 و E42 للعزلة R47، والحزمة E47 للعزلة R79، وغابت الحزم في هذا الاختبار للعزلتين R200 و R300. حُددت الأوزان الجزيئية التقريبية لها بين 250 bp (الحزمة E1) و 2200 bp (الحزمة E46) (الشكل 7.B).

أما في تقانة REP -PCR كانت جميع الحزم 70 polymorphic وكانت الحزمة A4 مميزة للعزلة R300، والحزمتان A5 و A26 للعزلة R88، والحزمتان A6 و A69 للعزلة R118، والحزمتان A15 و A20 للعزلة R45، والحزمة A24 للعزلة RK30، والحزمة A25 للعزلة R126، والحزمة A30 للعزلة R79، والحزم A31 و A58 و A61 و A66 للعزلة RJ23، والحزمة A45 للعزلة R61، والحزمة A48 للعزلة R127، والحزمة A57 للعزلة R47، والحزمة A60 للعزلة R62، وتراوحت الأوزان الجزيئية التقريبية لها بين 100 bp (A1) و 2300 bp (A70) (الشكل 7.C).

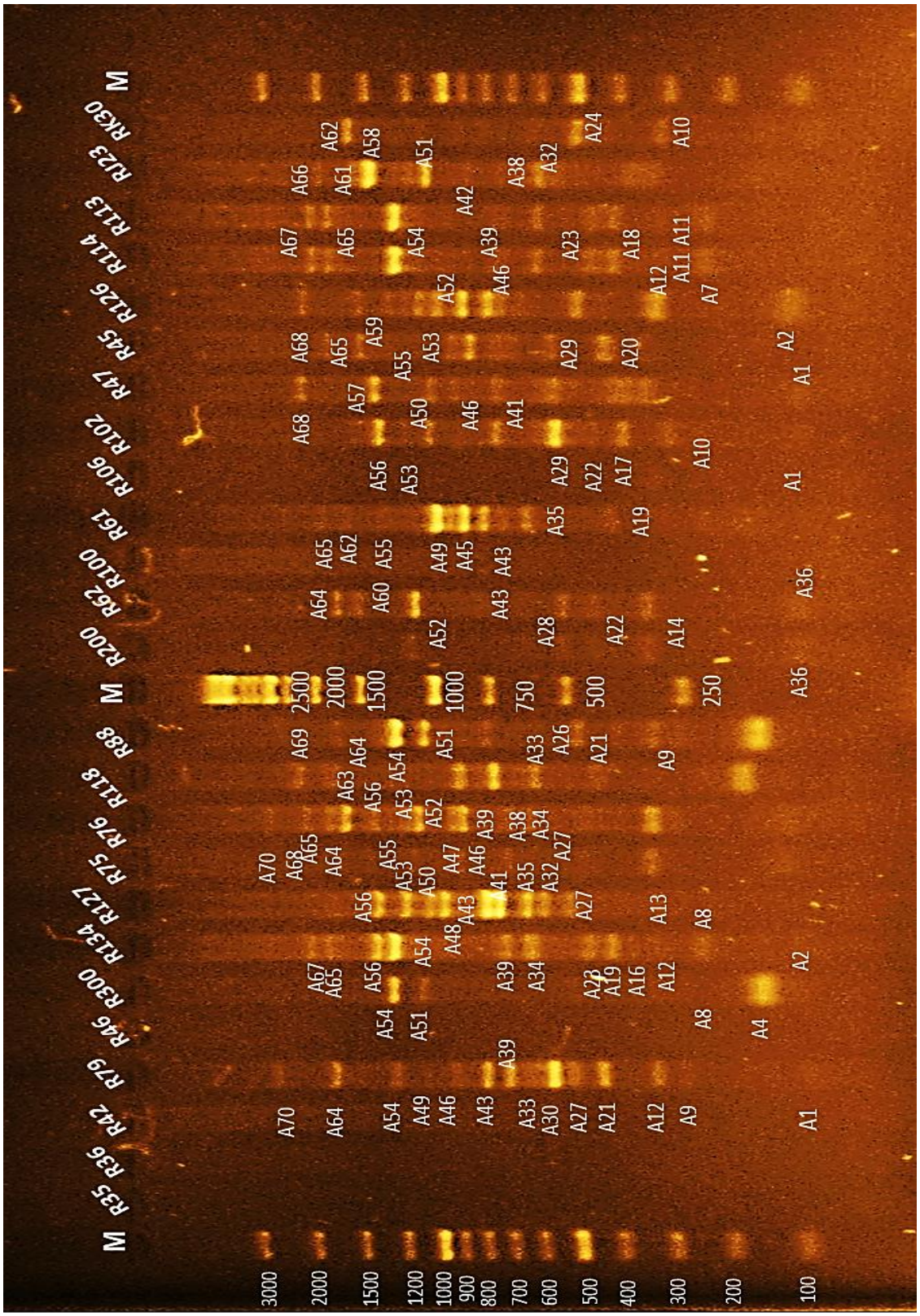
أعطت تقانة REP-pcr في هذا البحث أعلى تعددية شكلية لعزلات ريزوبيا المحلية وهذا يتوافق مع ما وجده Tajimaوآخرون (2000) بأن تقانة REP-pcr أعطت أكبر عدد من النطاقات متعددة الأشكال عند دراسته لعزلات من *Bradyrhizobium japonicum* و *Shinorhizobium meliloti* و *Rhizobium leguminosarum* في اليابان وتايلاند، في حين وجد Ogutcu وآخرون (2009) عند إتباعه تقانات rep-PCR أن تقانة Eric-PCR هي التقانة الأكثر قدرة على الكشف عن التعدد الشكلي بين عزلات رايزوبيوم الحمص *R. Leguminosarum sub sp. ciceri*.



الشكل 7.A. حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحلان الكهربائي على هلامة Agarose 1.5 % لنواتج تفاعل تقانات BOX-PCR لعزلات محلية من Rhizobia ومقارنتها مع عزلات نموذجية تابعة للجنس *Mesorhizobium* (راجع المواد والطرائق)



الشكل 7.B. حزم التعددية الشـــكلية التي ظهرت بالرحـــلان الكهربـــائي على هلامة Agarose 1.5 % لنواتج تفاعل تقانة ERIC-PCR لعزلات محلية من Rhizobia ومقارنتها مع عزلات نموذجية تابعة للجنس *Mesorhizobium* (راجع المواد والطرائق).



الشكلC .7. حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحـــــلان الكهربـــــائي على هلامة Agarose 1.5 % لنواتج تفاعل تقانة REP-PCR لعزلات محلية من Rhizobia ومقارنتها مع عزلات نموذجية تابعة للجنس *Mesorhizobium* (راجع المواد والطرائق).

4-3-1- تحليل البصمة الوراثية rep-PCR ورسم شجرة القرابة الوراثية:

تم كتابة نتائج الصور بالنظام الثنائي (1، 0) تعبيراً عن (الحزمة موجودة، أو غير موجودة) حسب التباعد بين العزلات البكتيرية عن طريق برنامج population genetic analysis POPGENE version 1.32 حسب معامل Nei (1978) وذلك لتقانات rep-PCR كاملة.

بلغت نسبة التشابه بين العزلتين البكتيريتين المرجعيتين (RK30، RJ23) 80%، بينما تراوحت نسبة التشابه بين العزلات المدروسة بين 37% و 100% في حين تراوحت نسبة التشابه بين العزلات البكتيرية المرجعية والعزلات المدروسة 38% و83% حيث كانت العزلة R102 المعزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص المجموع من منطقة ديمة اللحف–السويداء هي الأقرب للعزلة المرجعية RK30 من بنسبة تشابه 83% في حين كانت العزلة الأقرب للعزلة المرجعية RJ23 هي العزلة R45 المعزولة من عقد الحمص من منطقة ولغا– السويداء والعزلة R62 المعزولة من عقد نبات الحمص أيضاً والمجموعة من منطقة كفر اللحف– السويداء بنسبة تشابه 79% (جدول 10).

تتوافق هذه النتائج مع ماتوصل إليه Estrella وآخرون (2009) حيث تراوحت نسبة التشابه لـ 77 عزلة بكتيرية (*Mesorhizobium* و *Rhizobium*) معزولة من *Lotus tenuis* بين 55–80%، في حين كانت نسبة التشابه 95-100% بين 13 عزلة معزولة من اللوبيا *Vigna unguiculata* **L.** في كينيا شخصت باستخدام BOX- PCR (Ondieki *et al.*, 2017)، بينما أدى تطبيق BOX-PCR على 22 عزلة من نبات الفول السوداني *Arachis hypogaea* L. في البرازيل إلى نـسبة تشابــه 48–100% (De Lyra *et al.*, 2013).

رُسمت شجرة القرابة الوراثية ذات الجذر وبالاعتماد على تحليل التباين لاختبارات (ERIC-, REP-, BOX-PCR) مجتمعة بتطبيق طريقة UPEGMA بالاعتماد على معادلة Nei و Li (1979) وأظهرت Bootstrap على أفرع الشجرة (1000 iteration مرة) باستخدام برنامج POPGENE.

انقسمت شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على نتائج اختبارات البصمة الوراثية المستخدمة(الشكل 8) إلى عنقودين أحدهما ضم عزلتين بكتيريتين من العقد الجذرية لفول الصويا منطقة السحل–الرقة (R200،R300) والآخر انقسم إلى تحت عنقودين منفصلين حيث ضم تحت العنقود الأول عزلة وحيدة معزولة من النفل منطقة صلخد–السويداء R127 بينما انقسم تحت العنقود الثاني إلى مجموعتين حيث ضمت المجموعة الثانية عزلتين معزولتين من البازلاء منطقة مركز بحوث حمص–حمص (R113، R114)، وعزلة من العقد الجذرية للفول منطقة أبو جرش–ريف دمشق (R134)، أما المجموعة الأولى فقد انقسمت إلى فرعين حيث ضم الفرع الثاني عزلات بكتيرية من العقد الجذرية للفصة منطقة النبك–ريف دمشق (R75، R76) وعزلة معزولة من حندقوق–مركز بحوث حمص(R118) وعزلة من الحلبة–النبك–ريف دمشق(R126) بينما انقسم الفرع الأول إلى تحت فرعين ضم أحدهما العزلات (RK30، R45 ، RJ23، R47 ، R102) من عقد نبات الحمص (كفر اللحف–السويداء، ولغا–السويداء، جباب–درعا، ولغا–السويداء، ديمة اللحف–السويداء) على التوالي وضم تحت الفرع الثاني العزلات (R61، R62، R88، R79) المعزولة من العقد الجذرية للحمص (كفر اللحف–السويداء، كفر اللحف–السويداء، ديمة اللحف–السويداء، قنوات–السويداء) على التوالي.

وبناءً على ماسبق نلاحظ أن تقانات البصمة الوراثية قد وزعت العزلات البكتيرية للريزوبيا المتعايشة مع جذور البقوليات إلى أربع مجموعات (الشكل 8):

المجموعة الأولى تضم 9 أنماط وراثية تابعة للجنس *Mesorhizobium* المتعايش مع جذور نبات الحمص وموزعة على مناطق محافظة السويداء باستثناء العزلة المرجعية RJ30 من منطقة جباب–محافظة درعا.

المجموعة الثانية: تضم 4 أنماط وراثية تابعة للجنس *Sinorhizobium/Ensifer* المتعايش مع نباتات الحلبة والحندقوق و الفصة موزعة على محافظتي ريف دمشق(النبك) وحمص(مركز بحوث حمص)

المجموعة الثالثة: تضم 4 أنماط وراثية تابعة للجنس *Rhizobium* المتعايش مع جذور نباتات البازلاء والفول والنفل، موزعة على محافظات ريف دمشق(أبوجرش) و حمص (مركز بحوث حمص) والسويداء (صلخد).

المجموعة الرابعة: تضم نمطين وراثيين من منطقة واحدة السحل–الرقة تابعة للجنس *Bradyrhizobium* المتعايش مع جذور نبات الصويا.

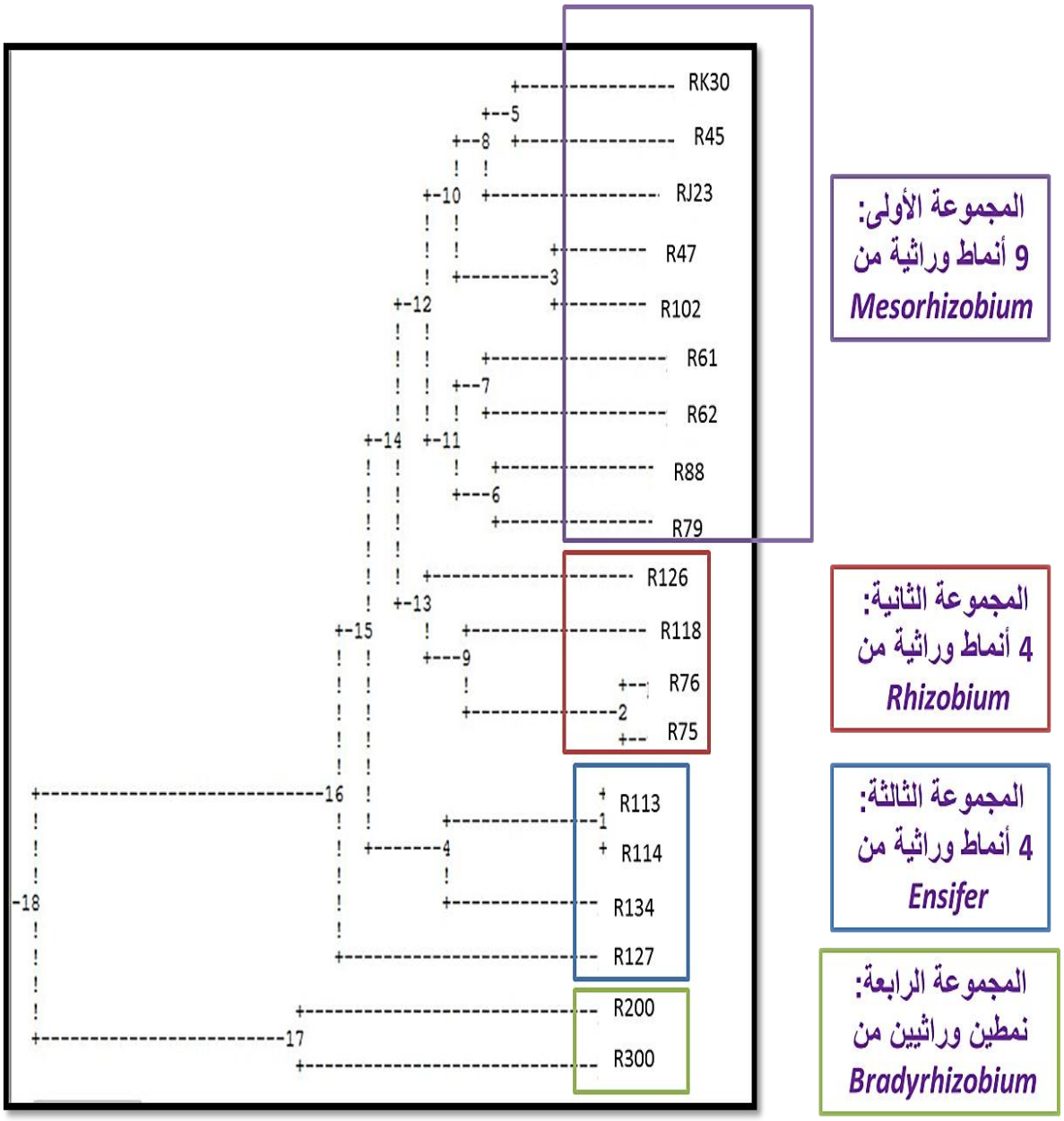
أظهرت النتائج أن توزع المجموعة الأولى والرابعة كان مرتبط بالمنطقة الجغرافية على عكس المجموعة الثانية والثالثة (الشكل 8)، وقد توافقت هذه النتيجة مع العديد من الدراسات حيث لاحظ Kozieł وآخرون (2022) عند إجراء اختبار ERIC وBOX لمقارنة التنوع الوراثي للبكتيريا المعزولة من العقد الجذرية لنبات *Trifolium pratense* المزروعة في منطقتين جغرافيتين تقعان في مناطق مناخية مختلفة (شبه قطبية ومعتدلة) في بولندا، أن العزلات المعزولة من المنطقة القطبية أقل تنوع وراثي من العزلات المعزولة من المنطقة المعتدلة، وأن السلالات توضعت في مجموعات مميزة تبعاً للمناطق المناخية الفردية.

كما وجد Kim وآخرون (2022) عند دراسة التوزع والتنوع الوراثي لأنواع *Bradyrhizobium* spp. في كوريا (254 سلالة من سلالات *Bradyrhizobium* من 97 عينة من فول الصويا– 9 أصناف) أن *B. elkanii* سيطر تواجدها على المناطق الجنوبية، بينما سيطر تواجد النوع *B. diazoefficiens* على معظم المناطق الوسطى والشمالية، وأثرت العوامل البيئية مثل متوسط درجة الحرارة السنوية وأصناف فول الصويا على توزع *Bradyrhizobium*. وبالتالي فإن سلالات *Bradyrhizobium* spp. الكورية تتوزع بشكل مختلف حسب السمة الجغرافية للمنطقة، ويعود التنوع الجيني العالي لكل سلالة إلى الموقع الجغرافي. ويمكن تفسير ذلك بحدوث النقل الأفقي للمورثات بين *Bradyrhizobium* spp. الذي حدث من أجل التكيف مع الظروف البيئية.

كذلك يعتقد Versalovic وآخرون (1994) أن تعدد الأشكال العالي الناتج عن تطبيق تقانات REP وERIC وBOX قد يكون مرتبط بعملية التطور التكيفي، مما يساعد في تفاعل الكائنات الحية الدقيقة مع الظروف القاسية في البيئات المختلفة مثل ارتفاع درجة الحرارة، وارتفاع نسبة الألومنيوم، والملوحة وغيرها.

وأضاف Gunnabo وآخرون (2021) أن لارتفاع المنطقة وجغرافيتها تأثير على التنوع الوراثي للسلالات الرايزوبية.

وبذلك نجد أن استخدام البصمات الوراثية المعتمدة على تقانات rep- PCR يساعدنا في فهم التنوع الوراثي للريزوبيا والتمييز العالي بين سلالاتها (Judd *et al.*, 1993; Zribi *et al.*, 2004)، والعديد من الأنواع الفرعية (الأنواع) أو السلالات الأخرى ذات الصلة الوثيقة و/أو تحديد العلاقة التطورية (Rademaker *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2007) كما أنها تقنية مناسبة لأنها سريعة، سهلة، وقابلة للتكرار (Healy *et al.*, 2005). مع الأخذ بعين الاعتبار أن نتيجة البصمة الوراثية الناتجة باستخدام تقانة rep–pcr تتأثر بتفاعل PCR نفسه والطريقة المستخدمة لتحليل النتائج على الهلامة، كما أن الخطأ الذي يحصل عند تحليل الهلامة باستخدام البرامج المختلفة يؤثر على فعالية هذه الطريقة في التمييز بين السلالات ذات القرابة الوراثية أو شبه المتطابقة وراثيًا (Johnson *et al.*, 2004).



الشكل 8. شجرة القرابة الوراثية لعزلات Rhizobia المدروسة والمرجعية الناتجة عن البصمة الوراثية rep-PCR حيث رسمت باستخدام معادلة Nei وLi (1979) باستخدام برنامج POPGENE (1000 iteration).

جدول 10. مصفوفة التشابه والتباعد لعزلات Rhizobia من الأجناس *Rhizobium* و *Mesorhizobium* و*Ensifer* و *Bradyrhizobium* حيث حسبت حسب معامل Nei (1978) باستخدام برنامج POPGENE .

رمز العزلة	RK30	RJ23	R113	R114	R126	R45	R47	R102	R61
RK30	****	0.8084	0.7725	0.7725	0.7545	0.8204	0.7665	0.8383	0.7784
RJ23	0.2127	****	0.7725	0.7725	0.7305	0.7964	0.7545	0.7784	0.7665
R113	0.2582	0.2582	****	1.0000	0.7305	0.7725	0.6946	0.7425	0.7545
R114	0.2582	0.2582	0.0000	****	0.7305	0.7725	0.6946	0.7425	0.7545
R126	0.2817	0.3140	0.3140	0.3140	****	0.7665	0.7246	0.7485	0.7365
R45	0.1980	0.2276	0.2582	0.2582	0.2660	****	0.7904	0.8144	0.7784
R47	0.2660	0.2817	0.3644	0.3644	0.3222	0.2352	****	0.8922	0.7126
R102	0.1764	0.2505	0.2977	0.2977	0.2897	0.2053	0.1140	****	0.7485
R61	0.2505	0.2660	0.2817	0.2817	0.3058	0.2505	0.3389	0.2897	****
R62	0.2127	0.2276	0.2897	0.2897	0.2817	0.2276	0.2817	0.2202	0.2202
R200	0.9436	0.9436	0.8275	0.8275	0.8695	0.9436	0.7873	0.9283	0.8413
R88	0.2127	0.2428	0.2897	0.2897	0.2817	0.2428	0.2817	0.2505	0.2660
R118	0.2352	0.3140	0.2505	0.2505	0.2582	0.2352	0.3058	0.2428	0.2897
R76	0.2505	0.3140	0.2977	0.2977	0.2738	0.2505	0.3389	0.2738	0.3389
R75	0.2428	0.2738	0.2738	0.2738	0.2660	0.2582	0.3305	0.2505	0.3140
R127	0.2897	0.3389	0.3731	0.3731	0.3644	0.3058	0.3473	0.2505	0.3140
R134	0.2817	0.2977	0.1907	0.1907	0.3389	0.2817	0.3558	0.2897	0.2428
R300	0.5029	0.5029	0.4833	0.4833	0.5536	0.4833	0.4546	0.4546	0.5330
R79	0.2428	0.2897	0.2897	0.2897	0.2817	0.2738	0.3305	0.2660	0.2505

رمز العزلة	R62	R200	R88	R118	R76	R75	R127	R134	R300	R79
RK30	0.8084	0.3892	0.8084	0.7904	0.7784	0.7844	0.7485	0.7545	0.6048	0.7844
RJ23	0.7964	0.3892	0.7844	0.7305	0.7305	0.7605	0.7126	0.7425	0.6048	0.7485
R113	0.7485	0.4371	0.7485	0.7784	0.7425	0.7605	0.6886	0.8263	0.6168	0.7485
R114	0.7485	0.4371	0.7485	0.7784	0.7425	0.7605	0.6886	0.8263	0.6168	0.7485
R126	0.7545	0.4192	0.7545	0.7725	0.7605	0.7665	0.6946	0.7126	0.5749	0.7545
R45	0.7964	0.3892	0.7844	0.7904	0.7784	0.7725	0.7365	0.7545	0.6168	0.7605
R47	0.7545	0.4551	0.7545	0.7365	0.7126	0.7186	0.7066	0.7006	0.6347	0.7186
R102	0.8024	0.3952	0.7784	0.7844	0.7605	0.7784	0.7784	0.7485	0.6347	0.7665
R61	0.8024	0.4311	0.7665	0.7485	0.7126	0.7305	0.7305	0.7844	0.5868	0.7784
R62	****	0.4731	0.7964	0.7784	0.7425	0.7605	0.7246	0.7545	0.6048	0.7964
R200	0.7485	****	0.4012	0.4192	0.3952	0.4132	0.4491	0.4192	0.6886	0.3772
R88	0.2276	0.9133	****	0.7665	0.7305	0.7485	0.7365	0.7545	0.6527	0.8204
R118	0.2505	0.8695	0.2660	****	0.7964	0.8024	0.7305	0.7725	0.5509	0.7784
R76	0.2977	0.9283	0.3140	0.2276	****	0.9701	0.7305	0.7605	0.5749	0.7665
R75	0.2738	0.8839	0.2897	0.2202	0.0304	****	0.7485	0.7784	0.5928	0.7844
R127	0.3222	0.8005	0.3058	0.3140	0.3140	0.2897	****	0.6946	0.6048	0.7126
R134	0.2817	0.8695	0.2817	0.2582	0.2738	0.2505	0.3644	****	0.5749	0.7784
R300	0.5029	0.3731	0.4266	0.5962	0.5536	0.5229	0.5029	0.5536	****	0.5689
R79	0.2276	0.9749	0.1980	0.2505	0.2660	0.2428	0.3389	0.2505	0.5641	****

4-4- اختبار قدرة البكتيريا المعزولة على تثبيط نمو فطر ذبول فوزاريوم على الوسط المغذي والحد من أعراضه ضمن الأصص:

أظهرت نتائج التضاد المخبري أن 31 عزلة من العزلات البكتيرية المدروسة (61) قد أثرت في نمو العزلتين الفطريتين F63 و F51، وكانت الفروق معنوية بين معظم العزلات (جدول 11، الشكل 10). انتمت 13 عزلة منها إلى مجموعة Rhizobia، و 18 عزلة إلى البكتيريا الجذرية Rhizobacteria المعزولة محلياً وغير المعرفة. أشار عدة باحثين إلى قدرة بعض أنواع مجموعتي Rhizobia و Rhizobacteria على تثبيط الممرضات الفطرية النباتية، حيث درست Khalifa و آخرون(2022) قدرة عزلات من البكتيريا الجذرية (*Pseudomonas*) على تثبيط *F.oxysporum* f. sp. *ciceris*، والمواد المضادة للفطريات التي تنتجها البكتريا، فلاحظوا أن العزلات البكتيرية المتفوقة قد ثبطت نمو الفطر بنسبة تراوحت 45.38 و 52.77 % وتسببت في تغيرات للمشيجة الفطرية تمثلت في تحبب وتكثف السيتوبلاسم، وتفتت وتشوه الخيوط الفطرية، كما أنتجت العزلات البكتيرية العديد من المواد المضادة للفطريات كالسليولاز، وسيانيد الهيدروجين، والأمونيا، والسيدروفور، والليباز، والبروتياز، وأكدت Kumari و Khanna (2014) أن المواد التي تنتجها البكتريا الجذرية المعزولة من جذور نباتات الحمص هي مستقلبات قابلة للانتشار والتطاير لتثبط نمو المشيجة الفطرية مخبرياً مثل الكاتيكول والسيدروفور، والأمونيا، وسيانيد الهيدروجين. كما أشار Kumar وآخرون (2011) إلى تأثيرات مشابهة للبكتريا المعزولة من العقد الجذرية لنبات الحلبة (*Ensifer meliloti*، *Rhizobium leguminosarum*) على الخيوط الفطرية لفطر فوزاريوم *Fusarium oxysporum*.

تتوافق نتائج التضاد في الزجاج مع Kucuk و Cevheri (2015) اللذان اختبرا تأثير 20 عزلة *Rhizobium* معزولة من عدة محاصيل بقولية في تركيا (العدس والحمص والفاصولياء والنفل) تجاه أربع أنواع من الفطور الممرضة للنبات (*F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. culnorum*) فأبدت هذه العزلات البكتيرية قدرة على تثبيط النمو الفطري وترافقت هذه القدرة مع إنتاج البكتريا لحمض

الإندول الخلي و السيديروفور كما كانت قادرة على إذابة الفوسفور، وكانت أفضل عزلة هي *R. phaseoli* أما العزلات الثلاث المتفوقة في هذه الدراسة فقد عزلت من نباتي الفول (134، 133) والحمص (61)، حيث أعطت العزلة 134 أعلى نسبة تثبيط تجاه الفطر F63 وبلغت 68.89% وتلتها العزلة 133 بنسبة تثبيط 65.93%، بينما أعطت العزلتان 61 و 134 أعلى نسبة تثبيط تجاه الفطر F51 وكانت 53.70% و 52.22% على التوالي، ولوحظ أن نسب التثبيط هذه أفضل مما هي في الدراسة التي أجريت في تونس على 21 عزلة *Rhizobium* لاختبار قدرتها على تثبيط نمو فطر *F.oxysporum* f. sp. *ciceris* حيث أثرت 14 عزلة منها على نمو مشيجة الفطر بنسبة 30%، بينما أدت أكثر العزلات فعالية Rh8 و Rh11 و Rh16 و PchSOM إلى تثبيط بنسبة 50% (Arfaoui *et al.*, 2006).

تفوقت عزلات Rhizobacteria على عزلات Rhizobia من حيث عدد العزلات التي ثبطت نمو فطر فوزاريوم الحمص على الوسط المغذي (94.7 %، 30.9%)، بينما تفوقت الأخيرة من حيث نسبة التثبيط المئوية (العزلة 134 و 61 بأفضل نسبة تثبيط 68.89% و 53.70 على التوالي)، ولقد ذكر Mahmood وآخرون (2015) أن بكتريا *Rhizobium spp.* كانت أفضل من البكتريا الجذرية *Bacillus subtilis* وأقل فعالية من البكتريـا الجذرية *Pseudomonas fluorescens* بنســـــبة تثبيط 60.79% و 57.68% و 70.94% على التوالي، بينما أشار Reddy وآخرون (2023) في دراسته لتأثير إحدى أنواع البكتريا الجذرية *Pseudomonas fluorescens* وبكتريا *Rhizobium spp.* على نمو مشيجة فطر فوزاريوم الحمص، أن تلك البكتريا الجذرية أعلى تـــأثيراً على الفطر من بكتريا الريزوبيا بنـــسبة تثبيط 60.29% و 23.13% على التوالي.

أبدت 21 عزلة بكتيرية قدرتها على تثبيط كلا العزلتين الفطريتين بينما لوحظ قدرة 4 عزلات (77، 56، 118، 103) على تثبيط العزلة الفطرية F63 دون العزلة F51، وثبطت 5 عزلات (108، 81، 96، 99، 119) العزلة الفطرية F51 دون العزلة F63 (جدول 11) (الشكل 9)، وهذا يخالف نتائج Khalifa وآخرون (2022) التي أشارت إلى تأثير جميع عزلات البكتريا الجذرية المختبرة على نمو كلا عزلتي فطر ذبول

فوزاريوم الحمص (Foc–S1، Foc–S2) ولكن كانت السلالات E1FP13 و E1FP4 و E1PP7 الأكثر فعالية ضد Foc–S1، بنسب 52.77٪ و 48.37٪ و 47.97٪ على التوالي، بينما كانت E1PP6 و E1FP13 و E1PP15 الأكثر فعالية ضد Foc–S2 بنسب 52.20٪ و 52.09٪ و 45.38٪ على التوالي.

قد يعود سبب اختلاف العزلات البكتيرية على تثبيط النمو الفطري والاختلاف بين مجموعتي الريزوبيا والبكتريا الجذرية في قدرتها على التضاد إلى تنوع الأجناس والأنواع البكتيرية المدروسة في هذا البحث واختلاف المواد المضادة للفطريات التي تنتجها، حيث أشار Tamiru وMuleta (2018) إلى أنه من بين 27 عزلة ريزوبية معزولة من جذور نبات الفول التي تم اختبار إنتاجها للأنزيمات المحللة، فقد كانت نسبة 26.1٪ و 44.4٪ و 14.8٪ إيجابية لإنتاج الكيتيناز والبروتياز والليباز على التوالي، وأظهرت تلك العزلات تثبيطًا عالياً لنمو الفطريات. بينما كانت ثمانية عزلات منها (29.6٪) إيجابية لإنتاج سيانيد الهيدروجين، و 24 عزلة (88.8٪) إيجابية لإنتاج IAA وأكثر من 50٪ من العزلات أذابت الفوسفات.

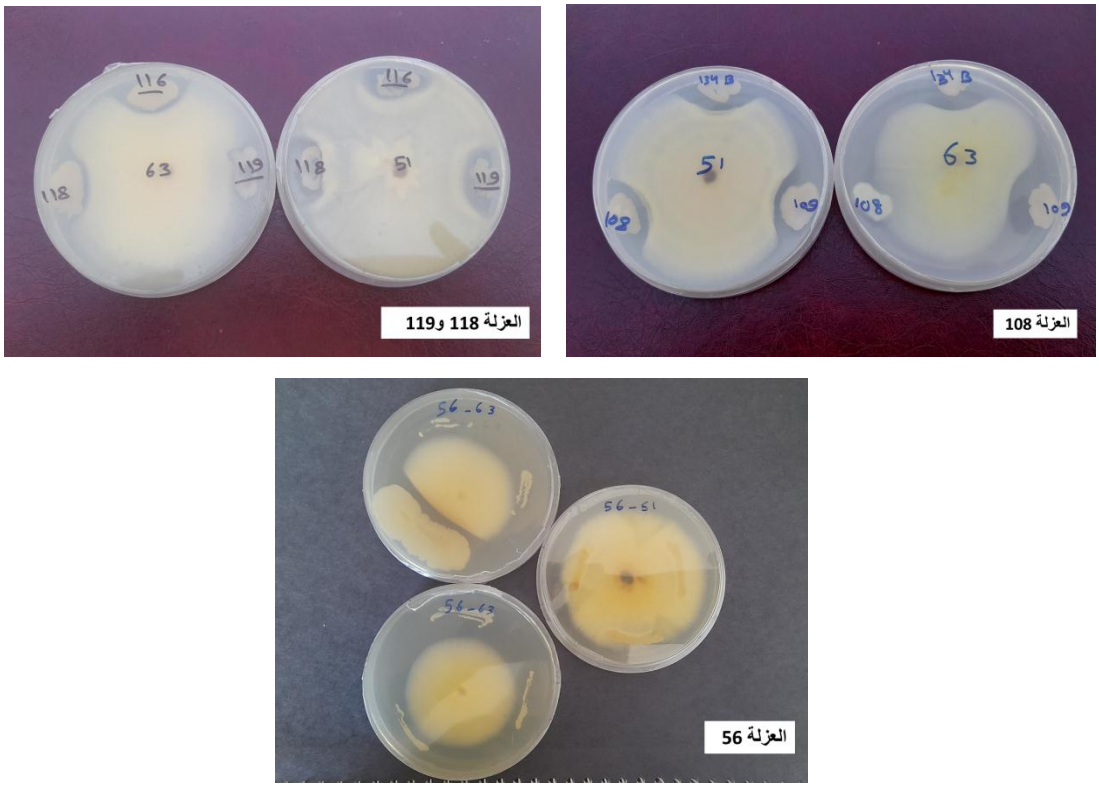
جدول 11. تأثير العزلات البكتيرية على العزلتين الفطريتين F63 و F51 *.

رمز العزلة البكتيرية	المجموعة	العائل البقولي	% للتثبيط تجاه الفطر F63	% للتثبيط تجاه الفطر F51
134	Rhizobia	فول	68.89^{a}	52.22^{A}
61	Rhizobia	حمص	48.93^{h}	53.70^{A}
133	Rhizobacteria	فول	65.93^{b}	49.26^{B}
117	Rhizobacteria	حمص	61.85^{c}	25.56^{I}
92	Rhizobacteria	حمص	61.85^{c}	33.70^{H}
94	Rhizobia	فصة	59.26^{d}	31.48^{I}
95	Rhizobacteria	فصة	58.89^{de}	39.63^{E}
77	Rhizobacteria	حمص	58.52^{de}	-
91	Rhizobacteria	حمص	57.41^{ef}	42.22^{D}
109	Rhizobia	فول	56.67^{f}	37.41^{F}
126	Rhizobia	حلبة	52.96^{g}	35.19^{GH}
134B	Rhizobia	فول	48.89^{h}	46.67^{C}
93	Rhizobacteria	فصة	47.78^{hi}	18.15^{L}
136	Rhizobacteria	بازلاء	47.41^{hi}	38.15^{EF}
56	Rhizobia	حندقوق	47.04^{i}	-
131	Rhizobacteria	بيقية	43.70^{j}	24.07^{JK}
86	Rhizobacteria	فول	43.33^{jk}	34.07^{H}
98	Rhizobia	فصة	41.85^{kl}	24.44^{JK}
200	Rhizobia	فول الصويا	40.74^{l}	18.15^{L}
132	Rhizobia	بيقية	35.19^{m}	11.85^{N}
54	Rhizobacteria	حندقوق	33.70^{m}	36.67^{FG}
90	Rhizobacteria	حمص	27.04^{n}	47.41^{C}
103	Rhizobia	حمص	24.81^{o}	-
116	Rhizobacteria	عدس	19.63^{p}	13.70^{M}
300	Rhizobia	فول الصويا	19.26^{p}	10.74^{N}
118	Rhizobia	حندقوق	17.04^{q}	-
108	Rhizobacteria	فول	-	50.37^{B}
81	Rhizobacteria	حمص	-	30.37^{I}
96	Rhizobia	فصة	-	30.37^{I}
99	Rhizobia	فصة	-	23.33^{K}
119	Rhizobacteria	حلبة	-	22.96^{K}

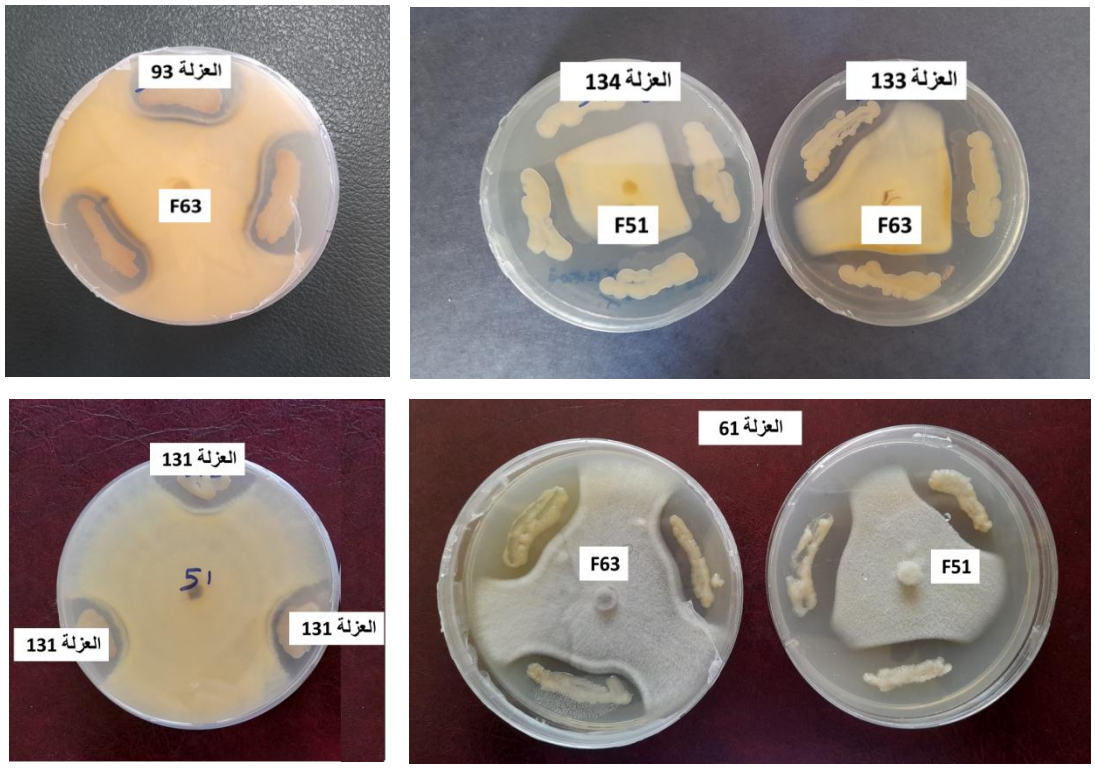
*: باستخدام طريقة القطاعات، و 3 مكررات لكل معاملة،

وحيث أن: الاحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين العزلات البكتيرية في تثبيط العزلة F63 والاحرف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين العزلات البكتيرية في تثبيط العزلة F51.

– : غياب التضاد بين العزلة البكتيرية والعزلة الفطرية.



الشكل 9. أمثلة عن بعض العزلات البكتيرية (118، 119، 108، 56) التي أثرت على إحدى العزلات الفطرية دون الأخرى (F51، F63) بعد 7 أيام من التلقيح.



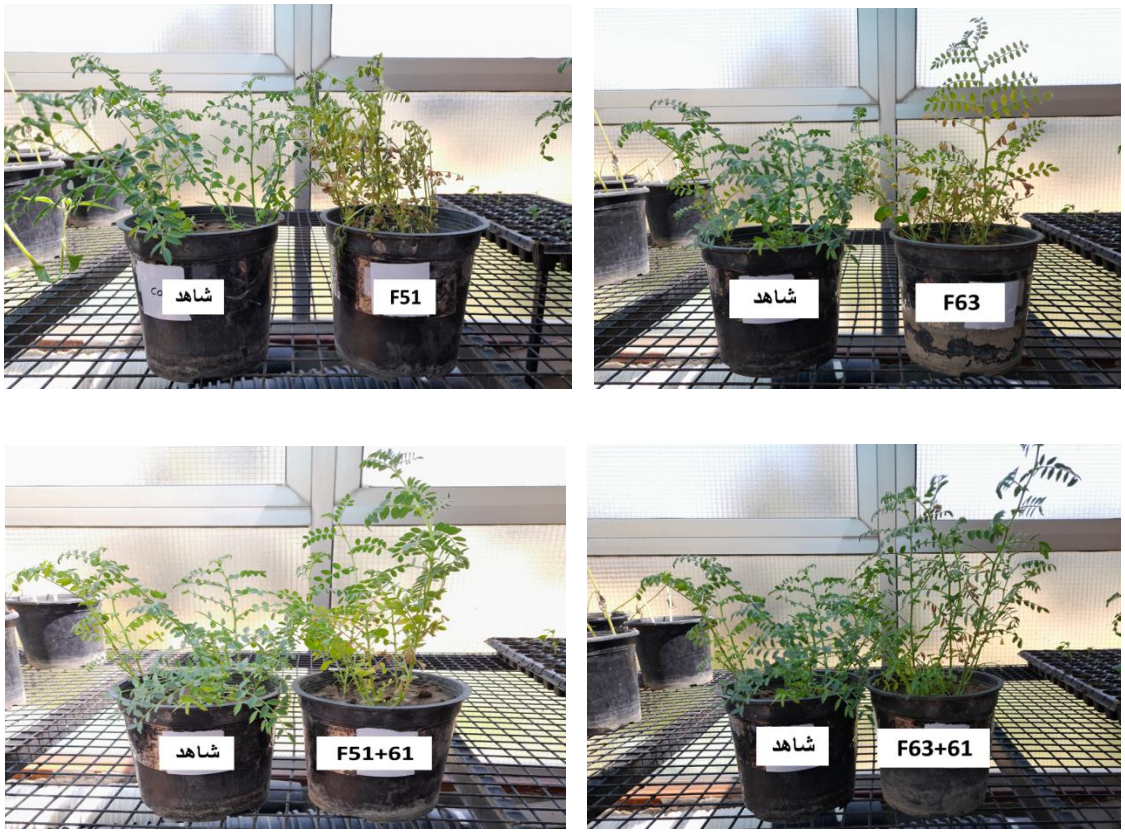
الشكل 10. التضاد ضمن الأطباق بين العزلتين الفطريتين F51، F63 وبعض العزلات البكتيرية المعزولة من جذور البقوليات والتابعة لمجموعتي Rhizobia، وRhizobacteria.

بالاستناد إلى نتائج التضاد في المختبر انتخبت إحدى العزلات الريزوبية المتفوقة في نسبة التثبيط لفطر فوزاريوم الحمص (العزلة 61)، واختبرت ضمن الأصص على نباتات الحمص، فأظهرت النتائج وجود فروق معنوية بالمقارنة مع الشاهد السليم من حيث طول المجموع الجذري، وبالمقارنة بين المعاملة F63×61 و F63 لوحظ فروق معنوية بينهما بكل القراءات باستثناء طول المجموع الخضري والجذري، أما بالمقارنة بين المعاملتين F51×61 و F51 فكان هناك فرق معنوي بينهما بالقراءات باستثناء طول المجموع الخضري ووزنه الجاف ووزن المجموع الجذري الرطب. وبالنتيجة فقد كان هناك فرق معنوي بين المعاملتين (F63×61 و F51×61) والشاهدين (F63 و F51) وزادت المعاملة البكتيرية من بعض مؤشرات النمو (الوزن الرطب المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف للجذر) وخفضت من نسبة الإصابة وشدة المرض.

توافقت النتائج مع دراسة أجريت في الهند للتحقق من قدرة ثلاث عزلات (Rh1,Rh2,Rh3) من الريزوبيا على تثبيط مرض الذبول الفوزاريومي على الحمص، فكانت العزلة Rh2 أكثر العزلات فعالية مخبرياً بنسبة تثبيط للنمو الفطري 46.66%، أما حقلياً فكانت نسبة الذبول 25.23% و نسبة تثبيط المرض 63.64% (Bobade *et al.*, 2022). كما دعم Romdhane وآخرون (2022) هذه النتيجة بتسجيل ثلاث عزلات (*M. ciceri* و *S. maliloti* و *M. mediterranum*) معزولة من العقد الجذرية لنبات الحمص في تونس كانت مثبطة لنمو *F. oxysporum*، وعندما أجرى Siddiqui وSingh (2004) تجربة في البيت الزجاجـــي في الهند لدراســـة تأثير بعض ملقحات التربة مثل (*Rhizobium* sp.) على نمو نبات الحمص و تثبيط فطر *F. oxysporum* f sp. *ciceris* لاحظ زيادة في نمو النبات وانخفاض في مؤشر الذبول. يعزى تأثير بكتريا Rhizobia إيجابياً على نمو النباتات و سلبياً على العوامل الممرضة من خلال إنتاجها للسيديروفور و المضادات الحيوية والهرمونات النباتية وتحفيز آليات الدفاع عند النبات كالأنزيمات (Tamiru and Muleta, 2018; Arfaoui *et al.*, 2006).

جدول 12. تأثير المعاملة بالعزلة البكتيرية 61 في تثبيط الفطر *F. oxysporum* f sp. *ciceris* وفي مؤشرات نمو نبات الحمص.

المعاملة	طول المجموع الخضري (سم)	الوزن الرطب للمجموع الخضري (غ)	الوزن الجاف للمجموع الخضري (غ)	طول المجموع الجذري (سم)	الوزن الرطب للمجموع الجذري (غ)	الوزن الجاف للمجموع الجذري (غ)	شدة المرض (%)	نسبة الإصابة (%)
شاهد سليم	26.00^{ab}	3.29^{ab}	1.12^{a}	25.67^{b}	2.26^{a}	0.80^{ab}	0.00^{d}	0.00^{c}
شاهد61	30.33^{a}	4.83^{a}	0.83^{a}	31.00^{a}	3.06^{a}	0.59^{bc}	0.00^{d}	0.00^{c}
شاهدF63	18.33^{c}	1.29^{c}	0.30^{b}	18.33^{c}	1.09^{c}	0.22^{c}	56.25^{a}	27.78^{a}
شاهدF51	17.33^{c}	1.77^{bc}	1.00^{a}	12.33^{d}	1.22^{bc}	0.22^{c}	37.50^{b}	22.22^{a}
61×F63	23.00^{bc}	4.14^{a}	1.06^{a}	20.00^{c}	2.55^{a}	1.0^{a}	16.67^{c}	13.89^{b}
61×F51	24.00^{abc}	4.19^{a}	1.12^{a}	21.67^{bc}	2.15^{ab}	0.89^{ab}	10.42^{cd}	11.11^{b}
$LSD_{0.05}$	**6.78**	**1.99**	**0.44**	**5.28**	**1.0**	**0.39**	**13.72**	**6.19**



الشكل 11. تأثير المعاملة بالعزلة البكتيرية الريزوبية 61 في الحد من أعراض الفطر *F. oxysporum f sp. ciceris* على نباتات الحمص ضمن الأصص، بالمقارنة مع الشاهد السليم.

4-5-أمثلة شروط انتاج السماد الحيوي:

أظهرت نتائج قياس الرطوبة لكل من المواد الحاملة أن التورب أكثرها رطوبة بنسبة 70% ثم التربة 30% المنخولة وأخيراً البيرلايت 3% ، أما درجة الـ pH فكانت أعلى في التربة (قلوي) Ph=8 يليها البيرلايت (معتدل) pH=7.3 وأخيراً التورب (حامضي) pH=3.32 تتوافق هذه النتائج مع Kihara (2019) عندما درس بعض الخواص الفيزيائية والكيميائية لعدة مواد حاملة من بينها التورب (الخث) فكانت الرطوبة تساوي 70.5 ودرجة الحموضة 3.63، أما Pennisi وآخرون (2015) و Pálková وآخرون (2020) فقد ذكروا أن البيرلايت الخام هو مادة خاملة حيوياً تبلغ درجة حموضتها 7-7.5 ومحتواها المائي 2-5 %. أما فيما يخص التربة المنخولة فقد ذكرت الدراسات أن درجة حموضة التربة ورطوبتها تختلف حسب تركيب التربة (Vogel *et al.*, 2023) والموقع الجغرافي وما يرافقه من ظروف مناخية (Xie *et al.*, 2015).

أظهرت النتائج أنه عند درجة حرارة 4 °س وصل أفضل تركيز للبكتريا بعد شهرين من التلقيح (2.2×10^8 CFU/ml)، يليها حفظ البكتيريا لمدة شهر (2×10^8 CFU/ml، 1.9×10^8 CFU/ml) ثم 15 يوم (1.9×10^8 CFU/ml ، 1.7×10^8 CFU/ml) بالنسبة للتربة المنخولة والبيرلايت أما التورب فلم يكن هناك فروق معنوية في التركيز طوال فترة التجربة. بالمقارنة بين المواد الحاملة كانت أفضل مادة هي التربة المنخولة تليها البيرلايت ثم التورب عند درجة حفظ 4 °س. كما كان تركيز البكتيريا يزداد خلال فترة التخزين، وبعد شهرين وصل الى اعلى تركيز ثم بدأ بالتناقص تدريجياً. أما عند درجة حرارة 25 °س فكان أفضل تركيز للبكتريا بعد شهرين من التلقيح بالنسبة لكل المواد الحاملة المختبرة (تربة منخولة، بيرلايت، تورب)، (9.6×10^8، 9.6×10^8، 9.5×10^8 CFU / مل على التوالي) ولم يكن هناك فرق معنوي بين المواد الحاملة في مدى قدرتها على حفظ حيوية البكتريا حيث كانت جميعها بنفس الكفاءة وذلك بعد شهرين من التخزين. أما أفضل المواد في حفظ حيوية البكتيريا طوال فترة التجربة فكانت التربة المنخولة تلاها البيرلايت ثم التورب. كما كان تركيز البكتيريا يزداد خلال فترة التخزين، وبعد شهرين وصل إلى أعلى تركيز ثم بدأ بالتناقص تدريجياً.

جدول 13. تغير تركيز اللقاح البكتيري مع مرور الزمن عند درجة حرارة 4 °س.

المادة الحاملة / الزمن	تربة منخولة	بيرلايت	تورب	Mean
1h	$10^7 \times 2.7^{pqr}$	$10^7 \times 1.9^{qrs}$	$10^7 \times 1.8^{qrst}$	$10^7 \times 2.2^{H}$
24h	$10^7 \times 6^{mn}$	$10^7 \times 5^{no}$	$10^7 \times 3^{pq}$	$10^7 \times 4.7^{G}$
48h	$10^7 \times 7^{kl}$	$10^7 \times 7.6^{kl}$	$10^7 \times 4^{op}$	$10^7 \times 6.5^{F}$
72h	$10^8 \times 1.2^{hi}$	$10^8 \times 1^{j}$	$10^7 \times 5.9^{mn}$	$10^7 \times 9.5^{E}$
96h	$10^8 \times 1.5^{e}$	$10^8 \times 1.4^{ef}$	$10^8 \times 1.1^{ij}$	$10^7 \times 1.3^{I}$
15d	$10^8 \times 1.9^{c}$	$10^8 \times 1.7^{d}$	$10^8 \times 1.2^{hi}$	$10^8 \times 1.6^{C}$
1m	$10^8 \times 2^{b}$	$10^8 \times 1.9^{bc}$	$10^8 \times 1.3^{gh}$	$10^8 \times 1.7^{B}$
2m	$10^8 \times 2.2^{a}$	$10^8 \times 2^{b}$	$10^8 \times 1.4^{fg}$	$10^8 \times 1.8^{A}$
3m	$10^7 \times 8.8^{k}$	$10^7 \times 7.3^{lm}$	$10^7 \times 4.7^{no}$	$10^8 \times 1.4^{D}$
4m	$10^7 \times 1.6^{rstu}$	$10^7 \times 1.4^{rstu}$	$10^6 \times 7.8^{stu}$	$10^7 \times 6.9^{F}$
5m	$10^6 \times 5^{tu}$	$10^6 \times 3.6^{u}$	$10^6 \times 2.2^{u}$	$10^6 \times 3.6^{J}$
Mean	$10^8 \times 1^{A}$	$10^7 \times 9.6^{B}$	$10^7 \times 6.4^{C}$	
$LSD_{0.01}$	$10^7 \times 1.4$=Treatment	$10^6 \times 4.2$= Substance		$10^6 \times 8$=Time

حيث أن: الاحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات التفاعل، أما الاحرف الكبيرة تدل على الفروق المعنوية بين متوسطات المعاملات، عند مستوى ثقة 99%

جدول 14. تغير تركيز اللقاح البكتيري مع مرور الزمن عند درجة حرارة 25°س.

المادة الحاملة / الزمن	تربة منخولة	بيرلايت	تورب	Mean
1h	$10^7 \times 1.4^{m}$	$10^7 \times 1.2^{m}$	$10^7 \times 1.5^{m}$	$10^7 \times 1.4^{HI}$
24h	$10^7 \times 4.7^{m}$	$10^7 \times 4.7^{m}$	$10^7 \times 2.4^{m}$	$10^7 \times 4^{GH}$
48h	$10^8 \times 1.8^{j}$	$10^8 \times 1.8^{j}$	$10^8 \times 1.2^{k}$	$10^8 \times 1.6^{F}$
72h	$10^8 \times 2.5^{i}$	$10^8 \times 2.6^{i}$	$10^8 \times 1.6^{jk}$	$10^8 \times 2.2^{E}$
96h	$10^8 \times 5.5^{f}$	$10^8 \times 4.4^{g}$	$10^8 \times 3.6^{h}$	$10^8 \times 4.5^{D}$
15d	$10^8 \times 7.9^{d}$	$10^8 \times 7.7^{d}$	$10^8 \times 7^{e}$	$10^8 \times 7.5^{C}$
1m	$10^8 \times 9^{ab}$	$10^8 \times 8.5^{bc}$	$10^8 \times 8^{cd}$	$10^8 \times 8.6^{B}$
2m	$10^8 \times 9.6^{a}$	$10^8 \times 9.6^{a}$	$10^8 \times 9.5^{a}$	$10^8 \times 9.5^{A}$
3m	$10^8 \times 1.1^{kl}$	$10^7 \times 5.9^{ml}$	$10^7 \times 3.7^{m}$	$10^7 \times 6.8^{G}$
4m	$10^6 \times 4^{m}$	$10^6 \times 5.7^{m}$	$10^6 \times 3^{m}$	$10^6 \times 4.3^{I}$
Mean	$10^8 \times 3.8^{A}$	$10^8 \times 3.5^{B}$	$10^8 \times 3.2^{C}$	
$LSD_{0.01}$=	$10^7 \times 5.4$ =Treatment	$10^6 \times 1.8$= Substance		$10^6 \times 3.3$=Time

حيث أن: الاحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروق معنوية بين متوسطات التفاعل، أما الاحرف الكبيرة تدل على الفروق المعنوية بين متوسطات المعاملات، عند مستوى ثقة 99%

أظهرت النتائج بالنسبة لدرجة حرارة الحفظ أن درجة 4°س تفوقت على الدرجة 25°س بشهر واحد فقط وكان ارتفاع تركيز البكتريا أبطأ، حيث ارتفع التركيز البكتيري ببطء عند درجة حرارة 4°س واستمر بالتركيز الموصى به 10^7 حتى الشهر الرابع ثم انخفض دون المستوى الموصى به في الشهر الخامس بينما كان تزايد التركيز عند درجة حرارة 25°س سريعاً ولكنه انخفض دون المستوى الموصى به في الشهر الرابع من التجربة، وهذا يوافق دراسة Kihara (2019) حيث كان الانخفاض في التعداد البكتيري أعلى عند 40 °س وأدنى عند 4 °س، وكذلك تتوافق مع Aloo وآخرون (2022) التي ذكرت أن احتفاظ اللقاح بحيويته كان عند درجة 8 °س أفضل مماهو عليه عند درجة حرارة 25 °س. قد يعود سبب هذه النتيجة لاختلاف الطبيعة البيولوجية للقاح، فإن درجات الحرارة العالية تسرع من نمو الخلايا البكتيرية وأنشطتها الاستقلابية التي تؤدي إلى تغيرات في درجة الحموضة وفقدان الحيوية وموت الخلايا (Bharti *et al.*, 2017).

أما مدة الحفظ فقد بلغت في هذه التجربة 3 و4 أشهر عند درجتي حرارة حفظ (4 ، 25°س على التوالي)، بينما تراوحت في بحث Kihara (2019) بين 4–6 أشهر حسب درجة حرارة الحفظ وفي تجربة Aloo وآخرون(2022) كانت 8 أشهر وهذه النتائج تخالف نتيجة دراستنا.

كانت أفضل مادة حاملة هي التربة المنخولة ثم البيرلايت ثم التورب وهذا يتوافق مع نتائج التجربة التي أجراها Kihara (2019) حيث تفوق المولاس وقشر نبات الكسافا *Manihot esculenta* على التورب كمادة حاملة. أما Aloo وآخرون (2022) فقد لاحظ أن أفضل مادة حفظ هي تفل قصب السكر عند حفظه في الغرفة والبراد بينما جاء بعده نخالة القمح في درجة حرارة الغرفة. كما ذكر Khavazi وآخرون (2007) أن البيرلايت و خلائطه (بيرلايت +تفل قصب السكر أو بيرلايت +مخلفات الشعير) حافظت على أعلى تركيز للبكتريا ولأطول مدة (6 أشهر) بالمقارنة مع غيرها من المواد الحاملة. بينما سجل Paudyal وآخرون (2021) أفضل حيوية للقاح البكتيري على الفحم وتربة الحديقة ونشارة الخشب. يمكن إرجاع اختلاف قدرة المواد الحاملة على الاحتفاظ بحيوية البكتريا إلى اختلاف تركيب هذه المواد وخواصها الفيزيائية والكيميائية (Aloo *et al.*, 2022; Sohaib *et al.*, 2020).

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1–تنتج عملية العزل من جذور النباتات البقولية عزلات ريزوبية **Rhizobia**، وعزلات مرافقة تنتمي لمجموعة البكتريا الجذرية **Rhizobacteria**.

2– تتميز بكتريا الريزوبيا والبكتريا الجذرية بقدرة متباينة على تثبيط نمو فطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* مخبرياً.

3– يؤثر تلقيح نباتات الحمص ببكتريا الريزوبيا مع وجود مسبب ذبول فوزاريوم إيجابياً على مؤشرات نمو النبات، ويقلل من الأعراض المرضية.

4– تفيد تقانات البصمة الوراثية في فرز العزلات البكتيرية حسب الجنس والنبات المعزولة منه.

5– من الممكن استخدام التربة المنخولة كمادة حاملة للقاح الرايزوبي تتميز بأنها رخيصة ومتوفرة لتشكيل مخصب حيوي تجاري.

5–يمكن الاحتفاظ بحيوية بكتريا الريزوبيا الملقحة على التربة المنخولة أو البيرلايت أو التورب عند درجة حرارة **4** أو **25** °س لمدة تراوحت **3**–**4** أشهر.

التوصيات Recommendations

1- حفظ السلالات المتفوقة للاستفادة منها في بحوث وتطبيقات لاحقة.

2- إجراء تسلسل نكليوتيدي للعزلات المتفوقة في هذا البحث وحفظها في البنك الوراثي.

3- إجراء تجارب حقلية لاحقة لتقييم كفاءة العزلات البكتيرية في حماية النبات من فطر فوزاريوم في الظروف الطبيعية، وتأثير ذلك على الإنتاجية.

4- اختبار تأثير التلقيح المزدوج لبكتريا الريزوبيا وأجناس بكتيرية أخرى غير مثبتة للآزوت كالبكتريا المحللة للفوسفات والبوتاسيوم على نمو وإنتاجية النبات.

المراجع

Reference

المراجع العربية

1. الدوس، منال. (2016). **توصيف عزلات محليّة من بكتريا *Rhizobium leguminosarum bv. Ciceri* وتقييم دورها في المقاومة الجهازيّة المحرّضة في الحمّص**. رسالة ماجستير. جامعة دمشق. ص 92.

2. صقر، أحمد محمد، والبطران، إيمان سالم، وصالح، عادل محمد عبد الوهاب. (2021). دراسة اقتصادية لأهم العوامل المؤثرة على إنتاج المحاصيل الحقلية البقولية في مصر. **المجلة المصرية للاقتصاد الزراعي**. 31(4):1229-1242.

3. عطية، شهيرة محمد رضا إبراهيم. (2017). محددات استجابة عرض المساحة المزروعة من المحاصيل البقولية في مصر. **Journal of Agricultural Economics and Social Sciences**. 8(12): 915-921.

4. علوش، ميساء، والقاعي، باسل، وكمال، سعيد أحمد. (2015). مسح حقلي لمرض ذبول الحُمّص *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* في شمال سورية و دراسة القدرة الامراضية لبعض عزلاته. **مجلة جامعة البعث للعلوم الهندسية**. 37(1).235-252.

5. علوش، ميساء. (2018). **انتشار وبائية مرض الذبول الفوزاريومي *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* على الحمص في سورية**. أطروحة دكتوراة، قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة البعث.170 ص.

References

1. Abdel-Monaim, M. F., Morsy, K. M. and Zyan, A. H. M. (2018). Efficacy of some organic com pounds in controlling Fusarium wilt disease, growth and yield parameters in chickpea plants. **Egyptian Journal of Agricultural Research.** 96:(2).
2. Adhikari, T.B., Gurung, S., Hansen, J. M., and Bonman, J. M and Bonman, M. (2012). Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. **Phytopathology** 102 (4):390-402.
3. Agrios, G.N. (2005). **Plant Pathology 5th Ed. Academic press Inc**. New York. p. 922.
4. Ahemad, M., and Kibret, M. (2014).Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **J. King Saud University Science.** 26, 1–20. doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001.
5. Alhayali S. M. and Al-Shakarchi, M. A. (2021). Genetic diagnosis of root nodules bacteria isolated from some leguminous Plants in Nineveh Governorate. **Journal of Education and Science**. 30(5): 163-177.
6. Allito, B. B., Ewusi-Mensah, N., and Logah, V. (2020). Legume-Rhizobium strain specificity enhances nutrition and nitrogen fixation in faba bean (Vicia faba L**.(. Agronomy** 10:826. doi: 10.3390/agronomy10060826.
7. Allouzi, M. M. A., Allouzi, S. M. A., Keng, Z. X., Supramaniam, C. V., Singh, A. and Chong, S. (2022). Liquid biofertilizers as a sustainable solution for agriculture. **Heliyon**, 8(12).
8. Aloo, B. N., Mbega, E. R., Makumba, B. A. and Tumuhairwe, J. B. (2022). Effects of Carrier Materials and Storage Temperatures on the Viability and Stability of Three Biofertilizer Inoculants Obtained from Potato (Solanum tuberosum L.) Rhizosphere. **Agriculture**. 12, 140.
9. Alves-Santos, F.M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J.M., Martín-Domínguez, R., Garcia-Benavides, P., Crespo, M.C., Díaz-Mínguez, J.M., Eslava, A.P. (2002). Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. **Plant Pathology**., 51, 605–611.

10. Andrews, M. and Andrews, M. E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**. 18: 705. doi:10.3390/ijms18040705. p.39.

11. Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I. and Cherif, M. (2006). Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium* f. sp. *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. **Journal of plant pathology**. 88(1). 67-75.

12. Arora, N. K., Tiwari, S., and Singh, R. (2014). Comparative study of different carriers inoculated with nodule forming and free living plant growth promoting bacteria suitable for sustainable agriculture. **Journal of Plant Pathology and Microbiology.** 5 (2), 1–3.

13. Astuti, A. and Mulyono, R. F. (2021). Characterization of *Rhizobium Indigenous* Isolates and Their Compatibility with Edamame Soybean. **Earth and Environmental Science**. 752.

14. Badri, M. and Ludidi, N. (2023). Biodiversity of the genus Medicago from Africa. **Genetic diversity recent advances and applications**. DOI: 10.5772/intechopen.108119**.** p.160.

15. Baldwin, I. L. and Fred, E. B.. (1929) "Nomenclature of the root nodule bacteria of the Leguminosae," **Journal of Bacteriology**. 17(2): 141–150.

16. Bashan, Y., Hernandez, J. P., Leyva, L. A. and Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biology and Fertility of Soils**. 35, 359–368.

17. Bethke, C. L. and Cullinan, M. (2023). PittMoss® as a Delivery Mechanism for Biofertilizers and Inoculants . **A Concept for advanced research and innovation**.

18. Bharti, N., Sharma, S.K., Saini, S., Verma, A., Nimonkar, V., Prakash, O. (2017). Microbial Plant Probiotics: Problems in Application and Formulation. In Probiotics and Plant Health, Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R., Eds., **Springer**: **Singapore**. pp. 317–335.

19. Bianco, L. (2014). Rhizobial infection in Adesmia bicolor (Fabaceae) roots. **Archives of Microbiology**. 196, 675–679. doi: 10.1007/s00203-014-1004-0.

20. Bilung, L. M., Pui, C. F., Su'ut, L. and Apun, K. (2018). Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as molecular typing tools for pathogenic Leptospira. **Disease markers**. 2018(1), 1351634.

21. Black C.A. 1965. "Methods of Soil Analysis: Part I Physical and mineralogical properties".**American Society of Agronomy,** Madison, Wisconsin, USA. 1-770.

22. Bobade, S. S., Chavan, R. A., Babhare, S. V. and Gambhire, V. S. (2022). Compatibility of *Rhizobium* spp. with agrochemicals used to control chickpea wilt incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Padwick) Snyder and Hansen. **The Pharma Innovation Journal** . 11(12). 1951-1957.

23. Carvajal-Muñoz, J.S., Carmona-Garcia,C. E. 2012. Benefits and limitations of biofertilization in agricultural practices. **Livestock research for rural development.** 24(3). p8.

24. Checcucci, A., diCenzo, G. C., Perrin, E., Bazzicalupo, M., Mengoni, A. (2019). Chapter 3 - Genomic Diversity and Evolution of Rhizobia. **Microbial Diversity in the Genomic Era**. P. 37-46.

25. Chen, Y. X., Zou, L., Penttinen, P., Chen, Q., Li, Q. Q., Wang, C. Q. and Xu, K. W. (2018). Faba Bean (Vicia faba L.) Nodulating Rhizobia in Panxi, China, Are Diverse at Species, Plant Growth Promoting Ability, and Symbiosis Related Gene Levels. **Frontiers in Microbiology**. 9.p.10.

26. Craze, B. (1990). Soil survey standard test method soil moisture content. **Department of Sustainable Natural Resources**, 1(5).

27. Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual Review of Plant Biology**. 66, 487–511. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040012.

28. Das, K., Prasanna, R. and Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: a potential biocontrol agent for soil borne fungal pathogens. **Folia Microbiologica.** 62:425–435.

29. De Curtis, F., Palmieri, D., Vitullo, D., Lima, G. (2014). First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* as causal agent of root and crown rot on chickpea (*Cicer arietinum*) in Southern Italy. **Plant Disease**., 98, 995.

30. Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology.**, 13, 414–430.

31. De Lajudie, P.M., Andrews, M., Ardley, J., Eardly, B., Jumas-Bilak, E., Kuzmanović, N., Lassalle, F., Lindström, K., Mhamdi, R., Martínez-

Romero, E. and Moulin, L., (2019) "Minimal standards for the description of new genera and species of rhizobia and agrobacteria," **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 69(7): 1852–1863**.**

32. De Lyra, M. d. C. C. P. d., de Freitas, A. D. S., Silva, T. A. and Santos, C. E. de R. S. (2013). Phenotypic and molecular characteristics of rhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) grown in Brazilian Spodosols. **African Journal of Biotechnology.** 12(17), pp. 2147-2156, 24.

33. Demers, J.E., Garzón, C.D., Jiménez-Gasco, M. d. M. (2014). Striking genetic similarity between races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* confirms a monophyletic origin and clonal evolution of the chickpea vascular wilt pathogen. **Eurpean Plant Pathology**., 139, 309–324.

34. Denison, R. F., and Kiers, E. T. (2004). Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. **FEMS Microbiology Letters**. 237, 187–193. doi: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb0 9695.x.

35. Deshwal, V. K., Dubey, R. C. and Maheshwari, D. K. (2003). Isolation of plant growth promoting *Bradyrhizobium* (Arachis) sp. With biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal root of peanut. **Current Science**. 84: 443-448.

36. Deshwal, V.K. and Chaubey, A. (2014). Isolation and Characterization of *Rhizobium leguminosarum* from Root nodule of *Pisum sativum* L. **Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)**. 2(8): 464-467.

37. Díaz-Valle, A., and Alvarez-Venegas, R. (2019). Enhancement of pathogen resistance in common bean plants by inoculation with *Rhizobium etli*. **Frontier Plant Scienc**. 10:1317. doi: 10.3389/fpls.2019.01317.

38. Downie, J. A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **FEMS Microbiology Reviews**. 34, 150–170.

39. El-Sersawy, M. M., Hassan, S. E. D., El-Ghamry, A. A., Abd El-Gwad, A. M. and Fouda, A. (2021). Implication of plant growth-promoting rhizobacteria of *Bacillus* spp. as biocontrol agents against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht. in *Vicia faba* L. **Biomolecular Concepts.** 12 (1).

40. Estrella, M. J., Muñoz, S., Soto, M. J., Ruiz, O. and Sanjuán, J. (2009). Genetic Diversity and Host Range of Rhizobia Nodulating Lotus tenuis in Typical Soils of the Salado River Basin (Argentina). **Applied and Environmental Microbiology**. p. 1088–1098. 75(4).

41. Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Laxmipathi Gowda C. L. and Krishnamurthy L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. **3 Biotech**. 5. 355–377.

42. Göttfert**,** M**.** 1993. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. **FEMS Microbiology Reviews.** 10(1-2):39-63.

43. Gunnabo, A. H., Heerwaarden, J. v., GeurtsE, R.. meskel, W., Degefu, T. and Giller, K. E. (2021). Phylogeography and Symbiotic Effectiveness of Rhizobia Nodulating Chickpea (*Cicer arietinum* L.) in **Ethiopia Microbial Ecology.** 81:703–716.

44. Haglund,W.A. and Kraft, J.M. (2001). Fusarium wilt. In Compendium of Pea Diseases and Pests, Kraft, J.M., Pfleger, F.L., Eds., APS Press: **St. Paul, MN, USA,** p. 14–16.

45. Hamid, B., Zaman, M., Farooq, S., Fatima, S., Sayyed, R.Z., Baba, Z.A., Sheikh, T.A., Reddy, M.S., El Enshasy, H., Gafur, A. and Suriani, N.L. (2021). Bacterial Plant Biostimulants: A Sustainable Way towards Improving Growth, Productivity, and Health of Crops. **Sustainability**. 13, 2856.

46. Hanson, A. (2008). Oxidative-Fermentative Test Protocol. **American Society for Microbiology.** 7p.

47. Hartley, E., Gemell, L. G., and Herridge, D. F. (2004). Lime pelleting inoculated serradella (Ornithopus spp.) increases nodulation and yield. **Soil Biology and Biochemistry.** 36, 1289–1294.

48. Haukka, k., Lindström, k., Peter, J. and Young, W. (1998). Three Phylogenetic Groups of *nodA* and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. **Applied and Environmental Microbiology**. 64(2): 419–426.

49. Hawkins, J. P. and Oresnik, I. J. (2021). The Rhizobium-Legume Symbiosis: Co-opting Successful Stress Management. **Frontiers in Plant Science**. 2022 Jan 3:12:796045. doi: 10.3389/fpls.2021.796045. eCollection. DOI: 10.3389/fpls.2021.796045.

50. Healy, M., Huong, J., Bittner, T., Lising, M., Frye, S., Raza, S., Schrock, R., Manry, J., Renwick, A., Nieto, R. and Woods, C. (2005). "Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR," **Journal of Clinical Microbiology.** 43(1), 199–207.

51. Helene, L. C. F., Klepa, M. S. and Hungria, M. (2022). New Insights into the Taxonomy of Bacteria in the Genomic Era and a Case Study with Rhizobia. **International Journal of Microbiology**. Article ID 4623713, 19 pages **.**
52. Herridge, D. (2008). "Inoculation technology for legumes," in Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses, eds M. J. Dilworth, E. K. James, J. I. Sprent, and W. E. Newton **(Dordrecht: Springer)**, 77–115. doi: 10.1007/978-1-4020-3548-7_4.
53. Holt, J. G., Kreig, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Williams and Wilkins, **(Eds). Baltimore, USA**. p. 40-169.
54. Hossain, A., Gunri, S. K., Barman, M., EL Sabagh, A. and da Silva, J. A. T. (2019). Isolation, characterization and purification of *Rhizobium* strain to enrich the productivity of groundnut (Arachis hypogaea L.). **Open Agriculture**. 4: 400-409**.**
55. Hungria, M. and Nogueira, M. A. (2023). **Nitrogen fixation. Marschner's Mineral Nutrition of Plants (Fourth Edition**). Chapter 16. P. 615-650.
56. Igolkina, A. A., Bazykin, G. A., Chizhevskaya, E. P., Provorov, N. A. and Andronov, E. E. (2019). Matching population diversity of rhizobial nodA and legume NFR5 genes in plant–microbe symbiosis. **Ecology and Evolution**. 2019;9:10377–10386.
57. Islam, R. 1984. Collection, isolation and maintenance of food legume Rhizobia. **In"Genetic resources and their utilization**". J. R. Witcombe. ICARDA, Aleppo, Syria. P.51-59.
58. Ismail, M. A., Abdel-Hafez, S. I. I., Hussein, N. A. and Abdel-Hameed, N. A. (2015) Contributions to the genus *Fusarium* in Egypt with dichotomous keys for identification of species. TMKARPIŃSKI PUBLISHER .Suchy Las, Poland. **Department of Botany and Microbiology, Faculty of Science, Assiut University**, Egypt. p 179.
59. Jaggi, V., Upadhayay, V. K., Joshi, S., Dasila, H., Sahgal, M. (2023). Rhizosphere engineering for sustainable agriculture. Advanced Microbial Technology for Sustainable Agriculture and Environment. **Developments in Applied Microbiology and Biotechnology**. 119-136.

60. Jaiswal, S. K., Mohammed M., Ibny, F. Y. I. and Dakora, F. D. (2021). Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. 4. p.14.

61. Jeyanthi, V. and Kanimozhi, S. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Prospective and Mechanisms: A Review. **Pure and Applied Microbiology.** 12, 733–749.

62. Jiménez-Díaz, R.M., Castillo, P., Jiménez-Gasco, M.d.M., Landa, B.B. and Navas-Cortés, J.A. (2015). Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. **Crop Protection**., 73, 16–27.

63. Johnson, L.K., Brown, M.B., Carruthers, E.A., Ferguson, J.A., Dombek, P.E. and Sadowsky, M.J. (2004) Sample size, library composition, and genotypic diversity among natural populations of Escherichia coli from different animals influence accuracy of determining sources of fecal pollution. **Applied and Environmental Microbiology**. 70: 4478–4485.

64. Jones, D. L. and Oburger, E. (2011). Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In: Phosphorus in Action. **Soil biology**. Springer Berlin, Heidelberg. p. 169-198. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_7.

65. Judd, A . K., Schneidemr, S., Vsky, D. and DE Bruin, M. J., (1993). Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**. 59,1702-1708.

66. Kaur, S., Gonçalves-Vidigal ,M. C., Davidson, J., Kirankumar, S. Mysore, and Pandey, A. K. (2023). Editorial: Disease and pest resistance in legume crops. **Front Plant Science**. 14: 1166387.

67. Kebede, E. (2021). Competency of Rhizobial Inoculation in Sustainable Agricultural Production and Biocontrol of Plant Diseases. **Frontiers in Sustainable Food Systems.** 5.p.22.

68. Khalifa, M. W., Rouag, N. and Bouhadida, M. (2022). Evaluation of the Antagonistic Effect of Pseudomonas Rhizobacteria on Fusarium Wilt of Chickpea. **Agriculture**. 12(3). 429.

69. Khan, A., Singh, A.V., Gautam, S.S., Agarwal, A., Punetha, A., Upadhayay, V.K., Kukreti, B., Bundela, V., Jugran, A.K. and Goel, R. (2023). Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science.** 14, p.1270039.

70. Khavazi, K., Rejali, F., Seguin, P. and Miransari, M. (2007). Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of Bradyrhizobium japonicum in soybean (Glycine max L.) inoculants . **Enzyme and Microbial Technology.** 41(6–7), P. 780-784.

71. Khoso, M. A., Wagan, S., Alam, I., Hussain, A., Ali, Q., Saha, S., Poudel, T. R., Manghwar, H. and Liu F. (2024). Impact of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on plant nutrition and root characteristics: Current perspective. **Plant stress**.11. p.16.

72. Kihara, M. E. 2019. **Effects of selected carrier materials and storage temperatures on survivle, viability and efficacy of rhizobia biofertilizers.** Master's thesis. P76.

73. Kim, Y., Shin, H., Yang, Y. and Hur, G. H. (2022). Geographical distribution and genetic diversity of *Bradyrhizobium* spp. Isolated from Korean soybean root nodules. **Applied Biological Chemistry** 65:39. https://doi.org/10.1186/s13765-022-00708-8.

74. Kingkaew, E., Phuengjayaem, S. and Tanasupawat, S. (2023). Rhizobia genome: Diversity, comparation, evolution and function. The Rhizosphere: **Structure, Ecology and Significance.** 99-126.

75. Kloepper, J.W. (2003) A Review of Mechanisms for Plant Growth Promotion by PGPR. **6th International PGPR Workshop**, 5–10 October, Calcutta, India.

76. Kozieł, M., Kalita, M. and Janczarek, M. (2022). Genetic diversity of microsymbionts nodulating *Trifolium pratense* in subpolar and temperate climate regions. **Scientific Reports**. 12:12144.

77. Kucuk, C. and Cevheri, C. (2015). In vitro Antagonism of Rhizobium Strains Isolated from Various Legumes. **journal of pure and applied microbiology.** 9(1): 503-511.

78. Kumar J. C. and Saraf, M. (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development.** 5(2): 108-119.

79. Kumari, S. and Khanna, V. (2014). Effect of antagonistic rhizobacteria coinoculated with *Mesorhizobium ciceris* on control of Fusarium wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **African Journal of Microbiology Research.** 8(12): 1255- 1265.

80. Kumar, H., Dubey, R. C., and Maheshwari, D. K. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of Fusarium wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). **Crop Protection**. 30(11), 1396-1403.

81. Kumar, G. A., Kumar, S., Bhardwaj, R., Swapnil, P., Meena, M., Seth, Ch. Sh. and Yadav, A. (2023). Recent advancements in multifaceted roles of flavonoids in plant–rhizomicrobiome interactions. **Frontiers in Plant Science**. 2023; 14: 1297706.

82. Leghari, S.J., Wahocho, N.A., Laghari, G.M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., Bhutto, T.A., Wahocho, S.A. and Lashari, A.A. (2018). Role of Nitrogen for Plant Growth and Development: A review. **Advances in Environmental Biology**. 10(9):209-218.

83. Laranjo, M, Alexandre, A. and Oliveira, S. (2013). Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the Mesorhizobium genus. **Microbiological research.** 169(1): 2-17

84. Lindeque, M. I. (2007). Diversity of root nodule bacteria associated with *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* species in South Africa (MSc Thesis). **University of Pretoria,** Pretoria, South Africa.

85. Liu, J., Yang, S., Zheng,Q., and Zhu, H. (2014). Identification of a dominant gene in Medicago truncatula that restricts nodulation by Sinorhizobium meliloti strain Rm41. **BMC Plant Biology**. 14:167. doi: 10.1186/1471-2229-14-167.

86. Liu, L., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. (1995). Introduction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, 85: 695-698.

87. Lorite, M. J., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M. J. and Sanjuán, J. (2010). Characterization of Strains unlike *Mesorhizobium loti* That Nodulate *Lotus* spp. in Saline Soils of Granada, Spain. **Applied and environmental microbiology**. 76(12): 4019–4026.

88. Long, S. R. (1996). *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. **Plant Cell.** 8,1885–1898. doi: 10.1105/tpc.8.10.1885.

89. Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and de Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**.60(7):2286-2295.

90. Ma, L. J., Geiser, D.M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M. and Kazan, K. (2013). Fusarium pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**., 67, 399–416.

91. Mahmoud, A. F. (2016). Evaluation of certain antagonistic fungal species for biological control of faba bean wilt disease incited by *Fusarium oxysporum*. **Journal of Phytopathology and Pest Management.** 3(2): 1-14.

92. Mahmood, Y., Khan, M. A., Javed, N. and Arif, M. J. (2015). Comparative efficacy of fungicides and biological control agents for the management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **JAPS: Journal of Animal and Plant Sciences**, 25(4), 1063-1071.

93. Malik, J.A. (Ed.) (2021). **Handbook of Research on Microbial Remediation and Microbial Biotechnology for Sustainable Soil**. In Advances in Environmental Engineering and Green Technologies, IGI Global: Pennsylvania, PA, USA,.

94. Mardad, I., Serrano, A. and Soukri, A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. **African Journal of MicrobiologyResearch.** 7(8),626-635.

95. Matse, D. T., Huang, C., Huang, Y. and Yen, M. (2020). Effects of coinoculation of *Rhizobium* with plant growth promoting rhizobacteria on the nitrogen fixation and nutrient uptake of *Trifolium repens* in low phosphorus. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition.** 43, 739–752. doi: 10.1080/01904167.2019.1702205.

96. Mawar, R., Manjunatha, B. L. and Kumar, S. (2021). Commercialization, diffusion and adoption of bioformulations for sustainable disease management in Indian arid agriculture: Prospects and challenges. **Circular Economy and Sustainability**. 1, 1367–1385.

97. McDevitt, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. . **American Society for Microbiology.** 9p**.**

98. Meena, P. K. and Nain, Y. (2022). Diseases of Chick Pea (*Cicer arietinum* L.) and their Management. **Just agricultur**. 3(2): 5.

99. Menna, P., Pereira, A. A., Bangel, E. V. and Hungria, M. (2009). "Rep- PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool," **Symbiosis**. 48(1-3), 120–130.

100. Michielse, C.B. and Rep, M. (2009). Pathogen profile update: Fusarium oxysporum. **Molecular Plant Pathology.**., 10, 311–324.

101. Mir, M. I., Kumar, B. K., Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S. and Hameeda, B. (2021). Characterization of rhizobia isolated from leguminous plants and their impact on the growth of ICCV 2 variety of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Heliyon 7**. p.13.

102. Mishra, J. and Arora, N. K. (2016). "Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: a sustainable approach," **in Bioformulations: For sustainable agriculture** (New Delhi: Springer), 3–33.

103. Mmbaga, G. W., Mtei, K. M. and Ndakidemi, P. A. (2014). Extrapolations on the Use of *Rhizobium* Inoculants Supplemented with Phosphorus (P) and Potassium (K) on Growth and Nutrition of Legumes. **Agricultural Sciences**. 5: 1207-1226.

104. Nagpal, Sh., Sharma, P., Sirari, A., Kumawat, K.C., Wati, L., Gupta, S.C. and Mandahal, K. S. (2021). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as model legume for decoding the co-existence of *Pseudomonas fluorescens* and *Mesorhizobium* sp. as bio-fertilizer under diverse agro-climatic zones. **Microbiological Research**. 247.

105. Nair, R. M., Pandey, A. K., War, A. R., Hanumantharao, B., Shwe, T., Alam, A. K. M. M., Pratap, A., Malik, S. R., Karimi, R., Mbeyagala, E. K. and Douglas, C. A. (2019). Biotic and abiotic constraints in mungbean production-progress in genetic improvement. Front. **Plant Science**. 10, 1340. doi: 10.3389/fpls.2019.01340.

106. Nakei, M. D., Venkataramana, P. B. and Ndakidemi, P. A. (2022). Soybean-Nodulating Rhizobia: Ecology, Characterization, Diversity, and Growth Promoting Functions. **Frontiers in Sustainable Food Systems**. 6:23p.

107. Navas-Cortés, J.A., Hau, B. and Jiménez-Díaz, R.M. (2000). Yield loss in chickpeas in relation to development of Fusarium wilt epidemics. **Phytopathology**, 90, 1269–1278.

108. Nehra, S., Gothwal, R. K., Varshney, A. K., Solanki, P. S., Chandra, Sh., Meena, P., Trivedi, P.C. and Ghosh, P. (2021). Bio-management of Fusarium spp. associated with fruit crops. Fungi Bio-Prospects . Sustainable

Agriculture, Environment and Nano-technology. **Fungal Diversity of Sustainable Agriculture**. 1: 475-505.

109. Nei, M and Li, W-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Genetics**.76(10):5269-5273**.**

110. Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**. 89(3):583-590.

111. Nene, Y. L., Reddy, M. V., Haware, M. P., Ghanekar, A. M,, Amin, K. S., Pande, S. and Sharma, M. (2012). Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control. Information Bulletin No. 28 (revised). Patancheru, A.P. 502 324, India: **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.** 60 pp.

112. Nick, G., Jussila, M., Hoste, B., Niemi, R. M., Kaijalainen, S., DE Lajudie, PH., Geillis, M., F. DE Bruijn, J. and Lindstorm, K. (1999). Rhizobia Isolated from Root Nodules of Tropica! Leguminous Trees Characterized Using DNA-DNA dot-blot Hybridisation and rep-PCR Genomic Fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**. 22: 287-299.

113. Noel, K.D. (2009). Rhizobia. **in Encyclopedia of Microbiology (Third Edition**. P. 261-277.

114. Noreen, R., Shafique, A., Haque, S. E., and Ali, S. A. (2016). Role of mungbean root nodule associated fluorescent *Pseudomonas* and rhizobia in suppressing the root rotting fungi and root knot nematodes in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Pakistan Journal of Botany**. 48, 2139–2145.

115. Ogutcu, H., Adiguzel, A., Gulluce, M., Karadayi, M. and Sahin, F. (2009). Molecular Characterization of *Rhizobium* Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey. **Romanian Biotechnological Letters.** 14(2): 4294-4300.

116. Ondieki ,D. K., Nyaboga, E.N., Wagacha, J. M. and Mwaura, F.B. (2017). Morphological and Genetic Diversity of Rhizobia Nodulating Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) from Agricultural Soils of Lower Eastern Kenya. **International Journal of Microbiology.** Article ID 8684921, 9 pages.

117. Oono, R., Anderson, C. G. and Denison, R. F. (2011). Failure to fix nitrogen by non-reproductive symbiotic rhizobia triggers host sanctions that

reduce fitness of their reproductive clonemates. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 278, 2698–2703. doi: 10.1098/rspb.2010.2193.

118. Osdaghi, E., Shams-Bakhsh,M., Alizadeh, A., Lak,M. R. and Maleki, H. H. (2011)**.** Induction of resistance in common bean by *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* and decrease of common bacterial blight. **Phytopathol. Mediterranea.** 50, 45–54.

119. Oryakhil, Q. and Irfan, M. A. (2020). Morphological Biochemical And Plant Growth Promoting Charac terization of Rhizobia Isolated From Root Nodule Of Cicer Arietinum**. Tropical Agroecosystems (TAEC).** 1(2): 59-63.

120. Pal, K. K. and Gardener, B. M. (2006) Biological Control of Plant Pathogens. Plant Health. Instructor.1-25, DOI: 10.1094/ PHI-A-2006-1117-02.

121. Pálková, H., Kureková, V., Madejová, J., Netriová, Z., Uhlík, P., Varga, P., Hronský, V. and Lexa, J. (2020). Determination of water content in raw perlites: Combination of NIR spectroscopy and thermoanalytical methods.. Spectrochimica Acta Part A: **Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 240, 118517.

122. Paudyal, S. P., Das, B. V., Paudel, V. R. and Paudel, N. (2021). Impact on the productivity of preparation on rhizobial inoculant carriers. **European Journal of Biological Research**. 11(2): 242-250.

123. Pawar, V. A., Pawar, P. R., Bhosale, A. M. and Chavan, S. V. (2014) Effect of Rhizobium on Seed Germination and Growth of Plants. **Journal of Academia and Industrial Research (JAIR),** 3, 84.

124. Pennisi, BV. and Thomas, PA. (2015). Essential pH Management in Greenhouse Crops pH and Plant Nutrition- Extension Bulletin, **Bulletin**, 1256, University of Georgia.

125. Pinto, F. G. S., Hungarria, M. and Mercante, F. M. (2007). Polyphasic characterization of Brazilian Rhizobium tropici strains effective in fixing N2 with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry** 39: 1851-1864.

126. Posso, E. J. S., de Prager, M. S. and Rojas, C. A. C. (2017). Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic

Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. **Acta Agronómica.** 66(2): 241-247.

127. Power, B., Liu, X., Germaine, K. J., Ryan, D., Brazi, D. and Dowling, D. N. (2011). Alginate beads as a storage delivery and containment system for genetically modified PCB degrader and PCB biosensor derivates of *Pseudomonas fluorescens* F113. **Journal of Applied Microbiology**. 110, 1351–1358. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04993.x

128. Rademaker, J. L.W. and DE Bruijn, F.J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In **DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews.** CAETANO-ANOLLES, G. and GRESSHOFF, P.M., eds., John Wiley and Sons, Inc, New York, pp. 1-26.

129. Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Versalovic, J.V. and de Bruijn, F.J. (2008) Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. **In Molecular Microbial Ecology Manual.** Kowalchuck, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., and van Elsas, J.D. (eds). Dordrecht, the Netherlands: **Springer**, pp. 611–644.

130. Rademaker, J. L.W., louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. and de Bruijn, F.J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**. 95(9):1098-111.

131. Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S. and Stougaard, J. (2007). LysMdomains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. **The EMBO Journal**. 26: 3923–3935. doi: 10.1038/sj.emboj.7601826.

132. Rahi, P., Giram, P., Chaudhari, D., Kiran, S., Khullar, A., Chandel, M. and Mahajan, B. (2020). *Rhizobium indicum* sp. nov., isolated from root nodules of pea (*Pisum sativum*) cultivated in the Indian trans-Himalayas. **Systematic and Applied Microbiology**, 43(5), 126127.

133. Ramírez-Suero, M., Khanshour, A., Martinez, Y. and Rickauer, M. (2010). A study on the susceptibility of the model legume plant Medicago truncatula to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. **Eurpean Plant Pathology.** 126, 517–530.

134. Reddy, S., Kumar, A., Sharma, S. and Prakash, S. (2023). Management of fusarium wilt of chickpea using integrated approaches leading induced systemic resistance. **Biopesticides International** . 19:(2), 157–164.

135. Rojas-Sánchez, B., Guzmán-Guzmán, P., Morales-Cedeño, L.R., Orozco-Mosqueda, M.D.C., Saucedo-Martínez, B.C., Sánchez-Yáñez, J.M., Fadiji, A.E., Babalola, O.O., Glick, B.R. and Santoyo, G. (2022). Bioencapsulation of microbial inoculants: mechanisms, formulation types and application techniques. **Applied Biosciences**, 1(2), pp.198-220.

136. Romdhane, S. B., De Lajudie, Ph., Fuhrmann, J. J. and Mrabet, M. (2022). Potential role of rhizobia to enhance chickpea-growth and yield in low fertility-soils of Tunisia. **Antonie van Leeuwenhoek**. 115(7):921-932. doi: 10.1007/s10482-022-01745-5.

137. Sadowsky, M.J. and Hur, H.-G. (1998) Use of endogenous repeated sequences to fingerprint bacterial genomic DNA. In Bacterial Genomics: Physical Structure and Analysis. De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., and Weinstock, G.M. (eds). **New York, NY, USA**: Chapman & Hall, pp. 399–413.

138. Salwan, R., Sharma, M., Sharma, A. and Sharma, V. (2023). Insights into plant beneficial microorganism-triggered induced systemic resistence. **Plant stress**. 7. p.11.

139. Sampaio, A. M., Araújo, S. de S., Rubiales, D. and Patto, M. C. V. (2020). Fusarium Wilt Management in Legume Crops. **Agronomy**. 10:(8), 1073.

140. Fahde, S, Boughribil, S., Sijilmassi, B. and Amri, Ahmed. (2023). Rhizobia: A Promising Source of Plant Growth-Promoting Molecules and Their Non-Legume Interactions: Examining Applications and Mechanisms. **Agriculture**. 13, 1279.

141. Schmidt, A. L. and Anderson, L. M. (2006) Repetitive DNA elements as mediators of genomic change in response to environmental cues. **Biology Review**. 81: 531–543.

142. Shamseldin, A. (2013). The Role of Different Genes Involoved in Symbiotic Nitrogen Fixation – Review. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry.** 8 (4): 84-94.

143. Sharma, N., Kumar, R., Singh, A.P., Sharma, R., Sharma, P., MeCarty, J. S. and Farooq, F. (2023). Legumes in Cropping System for Soil

Ecosystem Improvement: A Review. **Legume Research- An International Journal.** 1:9**.**

144. Siddiqui, Z. A. and Singh, L. P. (2004). Effects of soil inoculants on the growth, transpiration and wilt disease of chickpea. **Journal of Plant Diseases and Protection**. 111: 151–157.

145. Sindhu, S. S., Phour, M., Choudhary, S. R. and Chaudhary, D. (2014). Phosphorus Cycling: Prospects of Using Rhizosphere Microorganisms for Improving Phosphorus Nutrition of Plants. In: N. Parmar & A. Singh (Eds.), **Geomicrobiology and Biogeochemistry.** Springer Berlin, Heidelberg. p. 199-237.

146. Singh, Z. and Singh, G. (2018). Role of *Rhizobium* in chickpea (Cicer arietinum) production – a review. **Agricultural Reviews.** 39, 31–39. doi: 10.18805/ag.R-1699.

147. Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**. 38 (6), 485–492. doi: 10.1139/m92-080.

148. Sohaib, M., Zahir, Z.A., Khan, M.Y., Ans, M., Asghar, H.N., Yasin, S. and Al-Barakah, F.N. (2020). Comparative Evaluation of Different Carrier-Based Multi-Strain Bacterial Formulations to Mitigate the Salt Stress in Wheat. **Saudi Journal of Biological Sciences.** 27, 777–787.

149. Sprent, J. I., Ardley, J. K. and James, E.K. (2013). From north to south: A latitudinal look at legume nodulation processes. **South African Journal of Botany**. 89: 31–41.

150. Stenberg, J.A., Sundh, I., Becher, P.G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P.A., Friberg, H., Gil, J.F., Jensen, D.F., Jonsson, M. and Karlsson, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**. 94: 665–676.

151. Tajima, S., Hirashita, T., Yoshihara, K., Bhromsiri, A. and Nomura, M. (2000). Application of repetitive extragenic palindromic (REP)-PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis to the identification and classification of Japan and thai local isolates of *Bradyrhizobium japonicum*, *Shinorhizobium melilo*. **Soil Science and Plant Nutrition**. 46, 241–247. doi: 10.1080/00380768.2000.10408779.

152. Tamiru, G. and Muleta, D. (2018). The effect of rhizobia isolates against black root rot disease of faba bean (Vicia faba L) caused by

Fusarium solani. **Open Agriculture Journal**. 12, 131–147. doi: 10.2174/1874331501812010131

153. Tatsukami, Y. and Ueda, M. (2016). Rhizobial gibberellin negatively regulates host nodule number. **Scientific Reports**. 6, 27998.

154. Taylor, P., Lindbeck, K., Chen,W. and Ford, R. (2007). Lentil Diseases. In Lentil, **Springer**: Dordrecht, The Netherlands, pp. 291–313.

155. Thilakarathna, M. S. and Raizada, M. N. (2017). A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**. 177-196.

156. Tobes, R. and Ramos, J. L. (2005) REP code: defining bacterial identity in extragenic space. **Environmental Microbiology**. 7: 225–228.

157. Uddin, M., Hussain, S., Khan, M. M. A., Akhtar, M., Hashmi, N., Idrees, M., Naeem, M. and Dar, T. A. (2014). Use of N and P biofertilizers reduces inorganic phosphorus application and increases nutrient uptake, yield and seed quality of chickpea. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. 38, 47–54. doi: 10.3906/tar-1210-36.

158. Ussery, D.W., Binnewies, T.T., Gouveia-Oliveira, R., Jarmer, H. and Hallin, P.F. (2004) Genome update: DNArepeats in bacterial genomes. **Microbiology** 150: 3519–3521.

159. Van Berkum, P., Elia, P., Song, Q. and Eardly, B. D. (2012). Development and application of a multilocus sequence analysis method for the identification of genotypes within genus Bradyrhizobium and for establishing nodule occupancy of soybean (Glycine max L. Merr). **Molecular plant-microbe interactions,** 25(3), 321-330.

160. Vanparys, B., Spieck, E., Heylen, K., Wittebolle, L., Geets, J., Boon, N. and De Vos, P. (2007) The phylogeny of the genus Nitrobacter based on comparative rep-PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. **Systematic and Applied Microbiology.** 30: 297–308.

161. Velàzquez, E., GarcÍa-Fraile, P., RamÍrez-Bahena, M. H., Rivas, R. and MartÍnez-Molina, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. **Microbes for Legume Improvement**, Springer, Berlin, Germany, 2nd edition. 1–43.

162. Versalovic, J. and Lupski, J.R. (1998) Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. In Bacterial Genomics: Physical Structure

and Analysis. de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., and Weinstock, G.M. (eds). **New York, NY, USA**: Chapman & Hall, pp. 38–48.

163. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods Cell Mol Biol**. 5: 25–40.

164. Vessy, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**. 255(2): 571-586.

165. Via, V. D., Zanetti, M. E. and Blanco, F. (2016). How legumes recognize rhizobia. **Plant Signaling and Behavior.** 11:e1120396. doi: 10.1080/15592324.2015.1120396.

166. Vogel, S., Emmerich, K., Schröter, I., Bönecke, E., Schwanghart, W., Rühlmann, J., Kramer, E. and Gebbers, R. (2023). The effect of soil moisture content and soil texture on fast in situ pH measurements with two types of robust ion-selective electrodes**. The EGU interactive community platform**. 1470.

167. Volpiano, C. G., Lisboa, B. B., Granada, C. E., José, J. F. B. S., de Oliveira, A. M. R., Beneduzi, A., Perevalova, Y., Passaglia, L. M. P. and Vargas, L.K. (2019). "Rhizobia for biological control of plant diseases," in Microbiome in Plant Health and Disease, eds V. Kumar, R. Prasad, M. Kumar, and D. Choudhary. **Singapore: Springer**. 315–336.

168. Walker, L., Lagunas, B. and Gifford, M. L. (2020). Determinants of Host Range Specificity in Legume-Rhizobia Symbiosis. **Frontiers in Microbiology** . 11. Article 585749.

169. Wang, E. T., Tian, C. F., Chen, W. F., Young, J. P. W. and Chen, W. X. (2019). Ecology and Evolution of Rhizobia: **Principles and Applications. Singapore: Springer Nature**. doi: 10.1007/978-981-32-9555-1.

170. Wieser, M. and Busse, H. J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 50(3):1087–1093.

171. Wolde-Meskel, E., van Heerwaarden, J., Abdulkadir, B., Kassa, S., Aliyi, I., Degefu, T., Wakweya, K., Kanampiu, F. and Giller, K.E. (2018). Additive yield response of chickpea (Cicer arietinum L.) to rhizobium inoculation and phosphorus fertilizer across smallholder farms in Ethiopia.

Agriculture, Ecosystems & Environment. 261, 144–152. doi: 10.1016/j.agee.2018.01.035.

172. Wong, C. K. F., Saidi, N. B., Vadamalai, G., The, C. Y. and Zulperi, D. (2019). Effect of bioformulations on the biocontrol efficacy, microbial viability and storage stability of a consortium of biocontrol agents against Fusarium wilt of Banana. **Journal of Applied Microbiology.** 127 (2), 544–555. doi: 10.1111/jam.14310.

173. Wubie, G. and Adal, M. (2021). Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) nodulating rhizobia collected from south wollo zone**, Ethiopia. International journal of agronomy**. P11.

174. Wulandari, D., Songwattana, P., Gressent, F., Piromyou, P., Teamtisong, K., Boonkerd, N., Giraud, E., Tittabutr, P. and Teaumroong, N. (2022). Nod-Factor structure and functional redundancy of nod genes contribute the broad host range *Bradyrhizobium sp.* DOA9. **Rhizosphere** . 22.

175. Xie, Y., Zhang, J., Meng, L., Müller, C. and Cai, Z. (2015). Variations of soil N transformation and N2O emissions in tropical secondary forests along an aridity gradient**. Journal of Soils and Sediments**. 15(7). DOI:10.1007/s11368-015-1121-7.

176. Yan, XR., Chen, WF., Fu, JF., Lu, YL., Xue, CY., Sui, XH., Li, Y., Wang, ET. and Chen, WX. (2007) *Mesorhizobium* spp. are the main microsymbionts of *Caragana* spp. grown in Liaoning Province of China. **FEMS Microbiology Letters**. 271: 265–273.

177. Zahran, H. H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 63 (4): 968–989.

178. Zhang X. X.، Turner, S. L. , Guo, X. W., Yang, H.-J. , Debellé, F. , Yang, G.P. , Dénarié, J. , Peter, J., Young, W. and Li, F. D. (2000). The Common nodulation genes of *Astragalus sinicus* Rhizobia Are Conserved despite Chromosomal Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 2988–2995.

179. Zribi, K., Mhamdi, R., Huguet, T. and Aouani, M.E. (2004). Distribution and genetic diversty of rhizobia nodulating populations of *Medicago truncatula* in Tunisian soils. **Soil Biology and Biochemistry**. 36: 903-908.

Abstract

The research was carried out during 2018-2024 in Faculty of Agriculture-Damascus University and the National Commission for Biotechnology. The research aimed to isolate rhizobia bacteria from the roots of some legumes, identify the isolates and detect their phylogenetic relationship using rep-PCR DNA fingerprinting technique, and test their antagonistic ability against the locally isolated fungus causing vascular wilt to chickpea Fusarium oxysporum f sp. Ciceris. It also aimed to optimize some conditions for producing a local biofertilizer using the best rhizobia isolate. The Legum plants (Faba bean, chickpea, pea, sweet yellow clover, alfalfa, clover, soybean, fenugreek, vetch, lentil) were collected from the governorates of Damascus Countryside, Homs, Daraa, Al-Sweida, Lattakia, Hama and Raqqa, to isolate the bacteria from the root nodules of these plants on Yeast mannitol agar medium. Out of 109 resulted isolates, The results of all biochemical, molecular and artificial infection tests showed that 42 isolates belonged to the Rhizobia group, and 19 isolates belonged to the Rhizobacteria group. Based on the cross-infection, the Rhizobia isolates were divided into four genera: Mesorhizobium, which is symbiotic with chickpea, Rhizobium with faba bean and pea, Bradyrhizobium with soybean, and Ensifer with alfalfa and sweet yellow clover. The results of the rep-pcr DNA fingerprinting technique showed that the REP-PCR technique had the highest polymorphism among the isolates, and the similarity ratio with the reference isolates ranged from 38% to 83%. The rhizobia isolates were distributed by the phylogenetic tree into four groups, two of which were clustered according to the geographical region; The first group included reference isolates and 9 genotypes of the genus Mesorhizobium from Al-Sweida, and the fourth group included 2 genotypes of Bradyrhizobium from Raqqa. In contrast, the second group included 4 genotypes of the genus Sinorhizobium/Ensifer that symbiont with fenugreek, sweet yellow clover,

and alfalfa plants from Damascus Countryside and Homs, while the third group had 4 genotypes of Rhizobium from Damascus Countryside, Homs, and Sweida. The results of laboratory antagonism of the 61 isolates (42 Rhizobia, 19 Rhizobacteria) against the two local identified fungal isolates of chickpea Fusarium wilt (F51 and F63) showed that 31 bacterial isolates inhibited fungal growth, including 13 ones from rhizobia group and 18 from rhizobacteria. The two isolates; 134 (Rhizobium) and 61 (Mesorhizobium), achieved the highest inhibition rate of fungal growth, 68.89% and 53.70%, respectively. The isolate 61 was tested on chickpea plants in pots, the results showed that inoculation with Rhizobia bacteria increased the plant's ability to tolerate the fungal infection; causing a decrease of disease severity index and infection rate. Also, the optimization results to produce a biofertilizer using isolate 134 showed that 4°C was the best in preserving the vitality of bacteria for 4 months, while it did not exceed 3 months at 25°C. On the other hand, sifted soil was the best carrier material of bacteria, followed by perlite and then tourb. The bacteria achieved its highest concentration in the second month of inoculation, regardless of the carrier materials and temperatures tested**.**

Keywords: Rhizobia, Biochemical tests, Legume plants, Syria, rep-PCR fingerprinting technique, Fusarium, Chickpea, Antibiosis, Biofertilizer, Carrier material.

Syrian Arab Republic

Damascus University

Faculty of Agriculture

Department of Plant protection

Characterization and genetic fingerprinting of local isolates of root -knot bacteria (Rhizobia) and evaluation of their efficiency in inhibiting some pathogenic fungi of legumes.

This thesis submitted for degree of PhD in Agricultural Engineering, Plant Protection Department

by

Eng. Manal Saad Al-dous

Supervisors

Supervisor

Prof. Dr. Mahmoud abo Ghorrah

Plant protection Department

Damascus University

Co-Supervisor

Prof. Dr. Mohammad Fawaz Azmeh

Plant protection Department

Damascus University

2024