Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (133-149)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

Determination of the efficiency of the type *Sinorhizobium meliloti* L the formation of root nodules on different *Medicago sativa* varieties

Raghad N G Al-Zaidy [1]*, Najwa I. Al-Barhawi [2], Abdullah N Al-Niemi [3]

[1*,2,3] Department of Biology, College of Education for Pure science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: [1*] raghadnawaf@uomosul.edu.iq , [2] najwa_ibrahim@yahoo.com , [3] AbdullahNajim@yahoo.com

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

DOI: 10.33899/edusj.2021.168643, © 2021, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract

This study was carried out in the laboratories of the Research Unit of the Department of Biology / College of Education for Pure Sciences / University of Mosul/Iraq. *Sinorhizobium meliloti* bacteria were isolated from the root nodes of alfalfa plants cultivated in two areas of Nineveh Governorate, which are the wire house in the College of Education / University of Mosul and a farm belonging to Hawi Alkanesa Mosul/Iraq. , isolation of four isolates of *Sinorhizobium meliloti* from the root nodules formed on four species of *Medicago sativa* (Iraqi, Belgian, Pakistani and American varieties) and giving them the symbols Rh1, Rh2, Rh3 and Rh4. The isolates were diagnosed based on the phenotypic traits, their susceptibility to staining with Gram stain, agricultural characteristics, the biochemical and biological tests. The results showed that the highest susceptibility of rhizobal isolates to infecting a specific genotype (the plant host) from which they were isolated, which is due to the extent of compatibility between them represented by the success of infection and the formation of root nodules, and its development on the specialized host. All isolates (Rh4, Rh3, Rh2 and Rh1) of *E. meliloti* showed the ability to form root nodules on the roots of the seedlings of the four varieties with variation in the efficiency of these isolates ,The isolates (Rh1) as recorded the highest percentage of infection, which reached to 68%, followed by isolates (Rh2) and reached to 64% which was reflected in the rate of increase in average of the number of nodules / seedlings, which ranged between (2-3.25) and the high protein content of the pollinated seedlings which average ranged between (3.9 - 4.1) mg / gm, and accompanied by an increase in the rate of the number of vegetative branches therein.

Keyword: *Sinorhizobium meliloti,* Biochemical test, *Medicago sativa,* Root nodules, Protein content

تحديد كفاءة عزلات من *Sinorhizobium meliloti* على تكوين العقد الجذرية على اصناف الجت المختلفة *Medicago sativa* L

رغد نواف الزيدي[1*]، نجوى ابراهيم البرهاوي[2]، عبد الله نجم النعيمي[3]

[1*،2،3] قسم علوم الحياة, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل، العراق

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

الخلاصة:

تم اجراء الدراسة في مختبرات الوحدة البحثية التابعة لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة الموصل/العراق.اذ تم عزل بكتريا الرايزوبيوم من العقد الجذرية المتكونة على نباتات الجت المزروعة في منطقتين من محافظة نينوى وهي (البيت السلكي في كلية التربية/جامعة الموصل) ومزرعة تابعة لمنطقة حاوي الكنيسة. حيث عنيت الدراسة الحالية ، بعزل اربع عزلات للبكتريا من العقد الجذرية المتكونة على اربعة ضروب من نباتات الجت *Medicago sativa* L (الصنف العراقي و البلجيكي والباكستاني والأمريكي) واعطي لها الرموز Rh1 ، Rh2 ، Rh3 و Rh4. وشخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية و قابليتها للإصطباغ بصبغة كرام والخصائص الزرعية والاختبارات الكيموحيوية والبايولوجية التعايشية،واظهرت النتائج اعلى قابلية لعزلات الرايزوبيوم في اصابة نمط وراثي معين (المضيف النباتي) الذي عزلت منه والذي يرجع الى مدى التوافق بينهما المتمثل بنجاح الاصابة وتكوين العقد الجذرية وتطورها على المضيف المتخصص. وابدت جميع *Sinorhizobium meliloti* (Rh4, Rh3, Rh2 , Rh1) القابلية على تكوين العقد الجذرية على جذور بادرات الجت باصنافه الاربعة مع تباين كفاءة هذه العزلات , اذ سجلت العزلة (Rh1) أعلى نسبة مئوية للاصابة وبلغت 68% وتلتها العزلة (Rh2) وبلغت 64 % مما انعكس على ارتفاع معدل العقد/بادرة الذي تراوح مابين (2−3.25) ارتفاع معدل المحتوى البروتيني للبادرات الملقحة والذي تراوح مابين (3.9 −4.1) ملغم /غم ورافقه ارتفاع في معدل عدد الافرع الخضرية فيها.

الكلمات المفتاحية : الرايزوبيوم ,الاختبارات الكيموحيوية , نباتات الجت, العقد الجذرية,المحتوى البروتيني

المقدمة

تعد العائلة البقولية Leguminosae ثالثة كبرى العوائل التابعة للنباتات الزهرية، وتنقسم الى ثلاث تحت عوائل وهيPapilionoideae وMimosoideae وCaesalpinioideae [1].

وتضم هذه العائلة تقريباً 727 جنساً وفيها 1900 نوع نباتي ابتداء من الاعشاب الى الاشجار الضخمة [2]. وتضم العديد من النباتات المهمة كالجت *Medicago sativa* والبرسيم *Trifolium* ssp واللذين يمتازان بغزارة انتاجهما وقيمتهما الغذائية العالية, والحلبة *Trigonella foenum-graeum* والحمص *Cicer arientinum* L والباقلاء *Vicia faba* L والعدس *Lenus culinaris* L وغيرها [3].

ويعد نبات الجت من أهم المحاصيل البقولية العلفية والذي يستخدم كموديلاً بالدراسات الوراثية وهو من النباتات الواسعة الانتشار لوفرة إنتاجه ولقيمته الغذائية العالية وتأقلمه في مختلف البيئات الزراعية ولكونه من النباتات المعمرة فإن لجذوره القابلية على الأمتداد واختراق التربة لمسافات بعيدة قد تصل اطوالها الى(6) اقدام, هذا فضلاً عن قدرته على اقامة علاقة تعايشية مع بكتريا *S. meliloti* ينتج عنها تكوين عقد مثبتة للنتروجين تعمل على زيادة خصوبة التربة وتحسين نوعيتها [4]. يضم جنس *Medicago* أنواعاً عديدة منها *M.orbicularis* و *M.lupulinal* و *M. minima* و *M.sativa* و *M. falcate* [5].

وتمتاز أفراد هذه العائلة عن بقية العوائل النباتية الاخرى بقدرتها على تكوين علاقة تكافلية بينها وبين بكتريا الرايزوبيوم المستوطنة للتربة ينتج عنها تكوين العقد الجذرية التي تسهم في دورة تثبيت النتروجين [6] باختزالها للنتروجين الجوي الى الامونيا الذي يمثل فيما بعد الى الحامض الاميني Glutamine لتزويد النبات البقولي بالنتروجين القابل للاستعمال [7] ، وبسبب أهمية النباتات البقولية وفق ما ذكر

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

في الفقرات السابقة، ولغرض تحسينها ورفع محتواها البروتيني، توجهت الدراسات الحديثة الى محاولة تثبيت النتروجين الجوي من خلال التلاعب بالعائل النباتي او البكتريا المثبتة للنتروجين الجوي، ونتيجة لتأثير كل منهما وبشكل رئيس في تأسيس العلاقة التعايشية او بنائها، اذ اشارت احدى الدراسات الى امكانية التلاعب بالعائل البقولي لغرض تحسين النباتات وزيادة كمية النتروجين الجوي المثبت نتيجة لزيادة إعداد العقد [8] ، فضلاً عن انتخاب عزلات ذات صفات متميزة في تحملها لمختلف الظروف البيئية وذات كفاءة عالية في تثبيت النتروجين وبأعداد كبيرة وادخالها الى حيز التطبيق والذي كان له دور فعال انعكس بشكل واضح على انتاجية المحاصيل البقولية وخصوبة التربة[9].

وتضم عائلة Rhizabiaceae جنسين مختلفين هما جنس *Rhizobium* المسؤول عن تكوين العقد الجذرية على جذور نباتات العائلة البقولية [10], وتأتي هذه الإصابة بالرايزوبيوم لعوائلها النباتية وإقامة العلاقات التعايشية نتيجة للتعبيرالجيني للجينات المحمولة على بلازميدات التعايش pSym التي تعد من البلازميدات الكبيرة [11], وقد قسمت الافراد التابعة لجنس الرايزوبيوم الى مجموعتين بالأعتماد على عدد الأسواط وقابلية نموها على وسط خلاصة الخميرة، وتمتاز المجموعة الأولى: بسرعة نموها على وسط خلاصة الخميرة وبامتلاكها (2–6) أسواط محيطية وتشمل الأنواع الأتية: *R.ensifer* و*italic trifolii* *R.* leguminosarum biovar و *R_ leguminosarum biovar phaseoli*.و*R.leguminosarum*، اما المجموعة الثانية فتضم الأنواع التي تمتاز ببطئ نموها على وسط خلاصة الخميرة، وامتلاكها لسوط قطبي أو تحت قطبي وتشمل*R.japonicum* و *R. leguminosarum biovar lupine*.

هدفت الدراسة الحالية الى عزل بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذريةلاربع اصناف نباتية مختلفة الجت، وتشخيصها بالطرق الزرعية والمظهرية والفحوصات البايوكيمياوية واختبارات التخصص العائلي وانتخاب العزله الاكفأ على تكوين العقد الجذرية.

2. المواد وطرائق العمل

1.2 عزل بكتريا *Sinorhizobium meliloti* من العقد الجذرية لنباتات الجت

عزلت بكتريا ***Sinorhizobium meliloti*** من العقد الجذرية المتكونة على نباتات الجت المزروعة في منطقتين من محافظة نينوى وهي (البيت السلكي في كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة الموصل) ومزرعة تابعة لمنطقة حاوي الكنيسة الموصل /العراق. إذ استؤصلت العقد الجذرية المتكونة على الأصناف الأربعة من نباتات الجتL *Medicago sativa* (الصنف العراقي و البلجيكي والباكستاني والأمريكي)، وغسلت ثم عقمت وزعت القطع المعقمة سطحياً بوضعها على سطح 20 مل من وسط ثم زرعت على سطح وسط الاكار المغذي N.Agar لاختبار كفاءة التعقيم السطحي لها وحضنت لمدة (48) ساعة، ثم سحقت العقد المعقمة في (10) مل من وسط YEM السائل بالقضيب الزجاجي المعقم باللهب الكحولي، ثم نقلت حملة لوب من العالق الى سطح وسط YEM الصلب وزرعت بطريقة التخطيط للحصول على المستعمرات البرية المنفردة، وتم التحضين 24 ساعة بدرجة حرارة (28±2) °م وبعد انتهاء فترة التحضين نقلت مستعمرة واحدة من المستعمرات البرية الى سطح وسط YEM المائل الصلب في قناني صغيرة (Vial) وحفظت في الثلاجة (4°م) لحين استعمالها، وثم إعيد زراعتها كل (3–4) أسابيع للتأكد من حيويتها قبل الاستعمال، واعطيت الرموز للعزلات البرية كما في الجدول (1).

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

الجدول (1) عزلات الرايزوبيوم البرية من العقد الجذرية لاصناف نباتات الجت ومصادرها

نوع البكتريا	رمز العزلة	طبيعتها	المصدر
S.meliloti	(Rh1)	Wild Type	الصنف العراقي
S.meliloti	(Rh2)	Wild Type	الصنف البلجيكي
S.meliloti	(Rh3)	Wild Type	الصنف الباكستاني
S.meliloti	(Rh4)	Wild Type	الصنف الأمريكي

2.2 تشخيص بكتريا *Sinorhizobium meliloti*

1.2.2 الفحص المجهري Microscopic Examination

اختبرت الخصائص الشكلية لبكتريا *S.meliloti* البرية من العقد الجذرية لنباتات الجت بإصنافه الأربعة، وذلك بعمل مسحات منها وصبغها بصبغة كرام Gram Stain و فحصت بالمجهر الضوئي باستعمال العدسة الزيتية بقوة تكبير نهائي X (100) ولدراسة قابليتها على الإصطباغ وشكل الخلايا البكتيرية وترتيبها.

2.2.2 الإختبارات الكيموحيوية

أجريت الأختبارات البايوكيميائية للبكتريا المعزولة من العقد الجذرية لاصناف نباتات الجت *Medicago sativa* L المختلفة طبقاً لما جاء في [12][13].

وشملت الاختبارات الاتية

- ❖ إختبار انتاج كلوكانات β (1−3) الحلقية
- ❖ إختبار انتاج ليبفات السليلوز β (1−2) الحلقية
- ❖ اختبار انتاج 3-Ketolactose
- ❖ اختبار النمو على وسط الTSI
- ❖ اختبار تحمل الملوحة
- ❖ اختبار استهلاك السترات
- ❖ اختبار انتاج الكتاليز
- ❖ اختبار انتاج الأوكسديز
- ❖ اختبار تخمر الكاربوهيدرات
- ❖ اختبار الفلورة
- ❖ إختبار الحركة

3.2 اختبار قابلية العزلات المختلفة من بكتريا *S .meliloti* على تكوين العقد الجذرية المثبتة للنتروجين على بادرات الجت *Medicago sativa*

1. 3.2 مصدر البذور

حصل على بذور الاصناف الأربعة من الجت (العراقي , البلجيكي , الباكستاني والامريكي) من الأسواق المحلية.

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

2 .3. 2 التعقيم السطحي لبذور الجت

غسلت البذور بالماء ثم عقمت سطحياً بغمرها في محلول 2% هايبوكلورايت الصوديوم NaOCl (القاصر التجاري المخفف) لمدة (10) دقيقة وبعدها غسلت بالماء المعقم جيداً لازالة آثار المعقم. ووضعت البذور الملقحة على ورق ترشيح معقم لازالة الماء الفائض العالق بها [14].

3 .3. 2 انبات بذور الجت في الوسط الغذائي والحصول على البادرات الملقحة

زرعت البذور المعقمة بأصنافها الأربعة المستعملة لاغراض تكوين العقد الجذرية والملقحة ببكتريا *S.meliloti* سطحياً على سطح 25 مل من وسط NF الصلب خال من النتروجين [15] في أطباق بلاستيكية قطر (15) سم (Sterilin, U.K.) بواقع 100 بذرة/ طبق موزعة على سطح الوسط، وغلقت الأطباق بالبارافلم جميعاً وحفظت في حاضنة النمو في درجة حرارة (25±2) °م (24) ساعة في الظلام التام، وبعد إنباتها نقلت الى غرفة النمو وفي نظام الأضاءة والظلام التعاقبي (16 ساعة ضوء و 8 ساعات ظلام) وشدة إضاءة 2000 لوكس [16].

4 .3. 2 إختبار التخصص العائلي لعزلات بكتريا *S.meliloti*

لقحت بادرات الجت باصنافه الأربعة (العراقي , البلجيكي , الباكستاني والامريكي) المعقمة الناتجة من البذور بعمر (48) ساعة والنامية على وسط NF الصلب والحاوية على مجموعة جيدة من الشعيرات الجذرية، وذلك بغمر مجموعها الجذري في 5 مل من لقاح بكتريا *S.meliloti* البرية من الصنف نفسه، (15) دقيقة , ونقلت البادرات الملقحة الى سطح 20 مل من وسط NF الصلب في أطباق بتري زجاجية قطرها 9 سم، ورتبت البادرات الملقحة وغير الملقحة (عينة المقارنة) في صف واحد بمعدل (3–4 بادرات/طبق) ، وغلفت الأطباق بالبارافيلم وحفظت في الظروف المشار اليها الفقرة (2 .3. 2).

5 .3. 2 تلقيح الشعيرات الجذرية لبادرات الأصناف الاربعة من نباتات الجت ببكتريا الـ*S. meliloti* البرية من العقد الجذرية المتكونة عليها وبشكل متبادل

لقحت بادرات الجت المعقمة بأصنافه الأربعة (العراقي , البلجيكي , الباكستاني والامريكي) وفق الطريقة المذكورة الفقرة (2 .3. 4) في 2 مل من لقاح بكتريا *S.meliloti* المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت العراقي *M.sativa* L وحفظت العينات وفق الطريقة المذكورة انفا وكررت هذه المعاملة مع تلقيح الاصناف الاربعة ايضاً بعالق بكتريا *S.meliloti* البرية من العقد الجذرية لنباتات الجت (البلجيكي , الباكستاني و الأمريكي) وذلك لمعرفة قابلية البكتريا على اصابة بادرات الجت التابعة للاصناف البرية منها ومقارنتها مع قابلية البكتريا على اصابة بادرات الجت من الصنف البرية منه.

6 .3. 2 فحص المجموع الجذري للبادرات بالمجهر الضوئي وتصويرها

فحصت الشعيرات الجذرية السليمة (غير المشوهة) لبادرات الجت غير الملقحة والمشوهة في البادرات الملقحة ببكتريا *S.meliloti* الفقرة (2 .3. 4)، والنامية في وسط NF الصلب بالمجهر الضوئي المركب, ثم صورت جميع العينات بالكاميرا الرقمية.

4 . 2 تقدير المحتوى البروتيني في العينات النباتية

استخدمت طريقة Lowry وآخرون [17](1951) والمحورة من قبل Schacterle and Pollack [18] في استخلاص وتقدير المحتوى البروتيني لبادرات الجت غير الملقحة والملقحة ببكتريا بعزلات *S. meliloti* البرية من الأصناف الأربعة للجت (العراقي ,

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

البلجيكي , الباكستاني و الأمريكي), واعتمد البومين مصل البقر (BSA) كمحلول قياسي في رسم المنحني القياسي الذي اسقطت عليه امتصاصية العينات المذكورة أعلاه عن الطول الموجي 650 نانوميتر.

3. النتائج والمناقشة

1.3عزل بكتريا الرايزوبيوم من العقد الجذرية لنباتات الجت *M. sativa* وتشخيصها

1.1.3. الصفات المورفولوجية والزرعية لبكتريا الرايزوبيوم المعزولة

تميزت المستعمرات المنفردة النامية على الأطباق الحاوية على وسط YEM الصلب لجميع العزلات بلونها الكريمي وشكلها الدائري وسطوحها المرتفعة وبحافتها الملساء وبقوامها المخاطي. وظهرت خلاياها عصوية سالبة لصبغة كرام حين فحصها بالمجهر الضوئي المركب باستخدام العدسة الزيتية (100X).

2.1.3 الإختبارات الكيموحيوية

تمكنت الدراسة الحالية من عزل 4 عزلات (Rh4, Rh3, Rh2, Rh1) تعود لـ*S. meliloti* وتشخيصها من العقد الجذرية لاربعة اصناف نباتية للجت وذلك بالاعتماد على خصائصها المظهرية والوراثية والاختبارات الكيموحيوية والبايولوجية الخاصة بالتخصص العائلي اذ تطابقت صفاتها المظهرية المتمثلة بكونها عصوية قصيرة غير متجرثمة عند الفحص بالمجهر الضوئي سالبة لصبغة كرام, تنمو جيداً على بيئة المانيتول ومستخلص الخميرة، كما انها اخذت اشكالاً مختلفة متفرعة أو غير منتظمة عرفت بالبكتريود داخل العقد الجذرية التي يندر وجودها في المزارع النامية على البيئات الاصطناعية [19] وامتلاكها القدرة على الحركة وايجابيتها في فحص الاوكسديز والكتاليز نتيجة لتلوين ورقة الترشيح المشبعة بكاشف الأوكسيديز باللون البنفسجي ، وسلبيتها في انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين الجدول (2) طبقا لما ذكراه Erum & Bano [20] وتخميرها للعديد من الكاربوهيدرات كالكلوكوز والسكروز مع انتاج الحامض, بدليل تحويل لون الوسط الى الاصفر، بدون انتاجها الغاز [19], فضلا عن اكتسابها لصبغة Congo red في الوسط الحاوي عليها دليلا على انتاجها لليفات .Cellulose, اذ تلون هذه الصبغةamyloid وCellulose وتتداخل مع β-D-glucan وترتبط مع السكريات المتعددة الموجودة في كبسولة البكتريا [21] و وقابلية هذه البكتريا على الفلورة عند فحصها بجهاز UV light Transillumintor بعد نموها على وسط King medium

و جاءت قابلية العزلات الاربع على انتاج كلوكونات (1-3 β) الذي ظهر واضحاً من التقاط مستعمراتها لصبغة Aniline Blue تعمل على زيادة حركة البكتريا [22] ثم زيادة فرص ارتباطها بالقمم النامية للشعيرات الجذرية الملقحة بها [23] فضلاً عن مقاومة العزلات الاربع للتراكيز الملحية (1 و2 %) في النمو الذي يمكن ان يرجع لانتاج هذه البكتريا لعدد من المركبات التي تقوم بوظيفة الحماية من التأثيرات الازموزيةOsmoprotectants,اذ تشير أحدى الدراسات الى تفوق العزلات المتحملة للملوحة في تحفيزها لنشوء العقد الجذرية وتثبيتها للنتروجين الجوي بشكل أفضل من تلك الحساسة للملوحة [24].

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

الجدول(2) الإختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *S. meliloti* قيد الدراسة

الإختبارات		استجابة البكتريا المعزولة			
		Rh1	Rh2	Rh3	Rh4
Motility		+	+	+	+
Oxidase		+	+	+	+
Catalase		+	+	+	+
Citrate utilization		–	–	–	–
H_2S production		–	–	–	–
Acid from	Glucose	+	+	+	+
	Sucrose	+	+	+	+
	Maltose	–	–	–	–
Congo red		+	+	+	+
Sodium chloride tolerance	1 %	+	+	+	+
	2 %	+	+	+	+
Fluorese in King medium		+	+	+	+
3-ketolactose production		–	–	–	–
Production of cyclic Beta (1-3) glucans		+	+	+	+

3.1.3 اختبار التخصص العائلي لبكتريا الرايزوبيا المعزولة

تمت دراسة العلاقة التعايشية المتخصصة بين بكتريا *S. meliloti* ونبات الجت *M.sativa* L ومدى تأثير تباين العزلات البكترية المعزولة وانعكاساتها على جوانب العلاقة التعايشية بأستعمال عزلات مختلفة من الـ *S. meliloti*(Rh1، Rh2، Rh3 وRh4) المعزولة من الاصناف النباتية الاربعة للجت (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الامريكي) واجراء التلقيح المتبادل لهذه الاصناف باستعمال هذه العزلات, ومن ثم اجراء عملية الفحص الدوري للأطباق الحاوية على بادرات الجت الملقحة بالعزلات الاربع من بكتريا *S. meliloti* لمتابعة مراحل تكوين العقد الجذرية, ابتداء من تشوه الشعيرات الجذرية بالمجهر الضوئي المركب، باشكال ملتوية او ملتفة تعرف بـ(خطاف الراعي) ثم تكوين العقد ألأولية والناضجة بعد مرور اسبوعين الى 3 أسابيع من التلقيح وكالأتي:

1.3.1.3 تكوين العقد الجذرية في بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. meliloti*(Rh1) المعزولة من نباتات الجت (الصنف العراقي)

أظهرت نتائج تلقيح بادرات الجت باصنافه الاربعة (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الأمريكي) ببكتريا *S. meliloti* المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف العراقي) تشوهات واضحة للشعيرات الجذرية انتهت بتكوين عقد جذرية على الجذر الرئيس لجميع الأصناف وعلى الجذور الجانبية للصنفين الباكستاني والامريكي وبمعدل (6، 3، 2، 2) عقدة/نبات على التعاقب، وسجل الصنف العراقي أعلى نسبة للنباتات المكونة للعقد اذ بلغت (76)% في حين سجل الصنف الباكستاني أدنى نسبة مئوية وبلغت (60)% و تفاوتت أعداد الأفرع الخضرية من صنف الى آخر و تباين معدلات ارتفاع المجموع الخضري الجدول (3)، واشكال العقد المتكونة عليها

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

التي تميزت بشكلها المتفرع في بادرات (الصنف العراقي) والاقرب للكروي في كل من صنفي (الباكستاني والأمريكي) والمتطاول في الصنف (البلجيكي) كما هو واضح ايضا في الشكل (11) وجاءت هذه النتائج مطابقة لما اشارت اليه أحدى الدراسات [25](Price *et al.*, 1984) الى ان شكل العقدة لا يعتمد على السلالة البكتيرية وانما على العائل النباتي، وقد كُشف عن وجود جينات *mads-box* في نباتات الجت مسؤولة عن التشفير لبروتينات تعمل على تطوير العقد عند التلقيح بالرايزوبيوم ,وقد انعكس ذلك على المحتوى البروتيني للمجاميع الخضرية الذي بلغ (4.6 ، 4.2 ،3.5 ،4.2) ملغم/غم على التعاقب الشكل (1).

الجدول (3) العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh1)

أصناف الجت	عدد البادرات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	للنباتات المكونة للعقد%	موقع العقدة	شكل العقدة	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)
العراقي	19	6	76	الجذر الرئيسي	متفرع	4	6
البلجيكي	18	3	72	الجذر الرئيسي	متطاول	5	10
الباكستاني	15	2	60	الجذر الجانبي	اقرب للكروي	4	7
الأمريكي	16	2	64	الجذر الجانبي	اقرب للكروي	5	5

*** معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة**

2.3.1.3 تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh3) المعزولة من نباتات الجت (الصنف الباكستاني)

ابدت جميع اصناف الجت الملقحة ببكتريا *S. meliloti* المتخصصة المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف الباكستاني) القابلية على تكوين العقد الجذرية التي بلغت أعدادها (1، 2، 3،5) عقدة/ نبات على التعاقب ، التي تباينت في اشكالها فمنها شبه الكروي ,المتطاول ,شبه الكروي على الاصناف المختلفة كما في الشكل (1). وتظهر النتائج اختلافاً واضحاً في النسب المئوية لتكوين العقد، إذ ابدى الصنف الامريكي أعلى نسبة لتكوين العقد عند التلقيح بالبكتريا المعزولة من جذور الصنف الباكستاني وهي (80)% في حين أظهرت بادرات الجت (الصنف العراقي) أدنى نسبة لتكوين العقد اذ بلغت (44)% , ودفع ذلك الى تباين أعداد الأفرع الخضرية في البادرات الملقحة بهذه البكتريا ، نتيجة لاختلاف المحتوى البروتيني, وأظهرت النتائج ان العقد المتكونة كانت قد تكونت على الجذور الجانبية في حالتي الجت (الصنف الباكستاني، والبلجيكي) في حين اقتصر تكوينها على الجذور الرئيسة في حالتي الجت للصنف (العراقي، الامريكي) كما في الشكل (1).

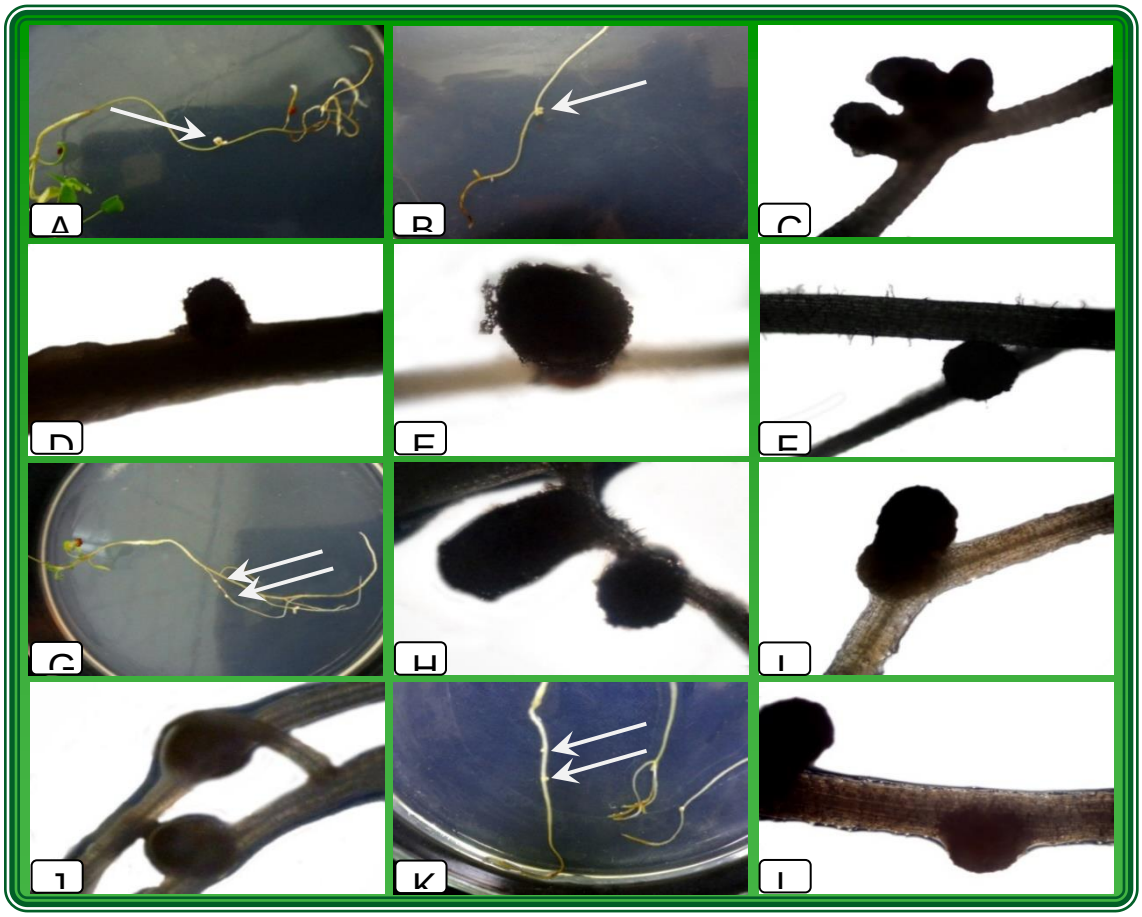
Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

الجدول (4) العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh3)

أصناف الجت	عدد البادرات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	% للنباتات المكونة للعقد	موقع العقدة على الجذر	شكل العقدة	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)
العراقي	11	1	44	الرئيسي	متطاول	3	7.8
البلجيكي	12	2	48	الجانبي	كروي	3	7.5
الباكستاني	15	3	60	الجانبي	كروي ، متطاول	5	6.0
الأمريكي	20	5	80	الرئيسي	اقرب للكروي	5	4.5

*** معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة**

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



الشكل (1) العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت *M.sativa* L(باصنافه الاربعة) الملقحة بعزلات بكتريا *S. melilloti* (Rh3, Rh1) على التعاقب.

F-A العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا(Rh1 *S. melilloti*).

A. العقدة الجذرية لمتفرعة (الجزء المؤشر)المتكونة على بادرات الجت (الصنف العراقي) بعمر اسبوعين.

B. الجذر الرئيس لبادرة الجت الصنف العراقي بعمر اسبوعين وتظهر فيها العقدة الجذرية المتفرعة (الجزء المؤشر).

C. عقدة جذرية متفرعة ناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف العراقي.

D. عقدة جذرية متطاولة ناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف البلجيكي.

E. عقدة جذرية كروية ناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصنف الباكستاني.

F. عقدة جذرية كروية ناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصنف الامريكي.

L-G العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا (Rh3 *S. melilloti*)

G. العقد الجذرية (الجزء المؤشر) المتكونةعلى الجذور الجانبية لبادرات الجت(الصنف الباكستاني).

H. العقد الجذرية الناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصنف الباكستاني.

I. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف العراقي.

J. العقد الجذرية شبه الكروية الناضجة (40×) على الجذور الجانبية للصنف البلجيكي. الجذر الرئيس لبادرات الجت الصنف الامريكي بعمر اسبوعين وتظهر فيها العقد الجذرية على.

K. الجذر الرئيس لبادرات الجت الصنف الامريكي بعمر اسبوعين وتظهر فيها العقد الجذرية على.

L. العقد الجذرية الكروية الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف الامريكي.

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

3.3.1.3 تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا (Rh2) *S. meliloti* المعزولة من نباتات الجت (الصنف البلجيكي)

تشوهت الشعيرات الجذرية السليمة لبادرات الجت باصنافه الأربعة (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الأمريكي) بعد تلقيحها ببكتريا *S. meliloti* المتخصصة والمعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف البلجيكي) التي نتج عنها استجابة البادرات لتكوين العقد الجذرية على جذورها بمعدل (2،5،3، 1) عقدة/نبات على التعاقب الجدول (5) وبلغت أعلى نسبة لتكوين العقد في البادرات الملقحة (84)% في بادرات الجت (الصنف البلجيكي) وأدناها في بادرات الجت (الصنف الامريكي)والتي بلغت (48)%، وتباينت أشكال العقد من نبات الى آخر ,وظهر تباين في حجم هذه العقد من صنف نباتي إلى آخر الشكل (2), ويرجع تفسير هذه الاختلافات في اشكال العقد المتكونة واعدادها الى وجود درجة عالية من التغاير الوراثي في العزلات البكتيرية المعزولة من اصناف مختلفة وترب مختلفة مما ربما يكون له دور في ظهور سلالات ذات انماط وراثية جديدة [26].

اذ اشارت احدى الدراسات Bhuraneswar *et al.*, [27] الى ان نجاح العلاقة التعايشية المتخصصة على قابلية عزلة الرايزوبيوم التي تمتلك قدرة محددة في اصابة نمط وراثي معين للمضيف النباتي وتنعكس على مدى التوافق بينهما المتمثل بنجاح الاصابة وتكوين العقد الجذرية وتطورها على المضيف المتخصص وذلك بفعل استنساخ جينات Nodulation genes التي يحفزها *nod* D genes و تعمل على اصابة المضيف المتخصص بفعل تنشيط اوبيرونات تكوين العقد *nod* operons بعد الاستجابة لمختلف المكونات المشتقة من المضيف النباتي [28].

ومن ناحية أخرى توصلت النتائج الى ان العقد الجذرية كانت قد تكونت على الجذور الرئيسي للبادرات الملقحة بهذه البكتريا باستثناء جذور البادرات الجت للصنفين البلجيكي والامريكي التي تكونت فيها العقد على الجذور الجانبية ،وتباينت بادرات الجت باصنافة الأربعة في معدل ارتفاع مجموعها الخضري الذي كان (9، 8.6، 6، 6.2) سم على التوالي مع اختلاف في اعداد الأفرع الخضرية. والذي انعكس على المحتوى البروتيني والذي تراوح ما بين (2.6–4.6) ملغم/غم الشكل (3) للمجاميع الخضرية المختلفة .

الجدول (5) العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا (Rh2) *S. meliloti*

أصناف الجت	عدد البادرات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	للنباتات المكونة للعقد%	موقع العقدة على الجذر	شكل العقدة	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)
العراقي	18	3	72	الرئيسي	اقرب للكروي	5	9
البلجيكي	21	5	84	الجانبي	متطاول	5	8.6
الباكستاني	12	1	48	الرئيسي	متطاول	3	6
الأمريكي	13	2	52	الجانبي	متطاول	4	6.2

*** معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة**

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

4.3.1.3 تكوين العقد الجذرية في اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا(*S. meliloti*)Rh4 المعزولة من نباتات الجت (الصنف الأمريكي)

أبدت أصناف الجت جميعها (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الأمريكي) تشوهات واضحة في شعيراتها الجذرية الملقحة ببكتريا ***S. meliloti*** المتخصصة المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت (الصنف الأمريكي) مما حفز على تكوين العقد الجذرية عليها وبمعدل (3، 2، 2،1) عقدة/ نبات على التعاقب كما هو واضح في الجدول (6)، وأخذت العقد الجذرية المتكونة على جذور على جميع اصناف بادرات الجت الشكل المتطاول، فيما عدا (الصنف الباكستاني) حيث كانت ذات شكل شبه كروية كما في الشكل(2) , ان اختلاف اعداد العقد المتكونة على بادرات الجت والتي تباينت مع اختلاف السلالة المستعملة في التلقيح وبلغت أعلى نسبة لتكوين العقد الجذرية (68)% لبادرات الجت (الصنف العراقي) ، وأدناها نسبة (44)% في بادرات الجت الباكستاني، وتباينت هذه العقد في اشكالها، والذي أثر بشكل ايجابي على المجاميع الخضرية والذي ينعكس مستقبلاً على اضفاء صفات ايجابية في النباتات المكونة للعقد من حيث نضارتها واخضرار اجزائها بالمقارنة مع تلك التي تمتلك اقل عدد من العقد او غير المكونة للعقد، إذ اشارت احدى الدراسات الى زيادة الاوزان الجافة والمحتوى البروتيني لنباتات الحمص *Chickpea* المكونة للعقد [29].

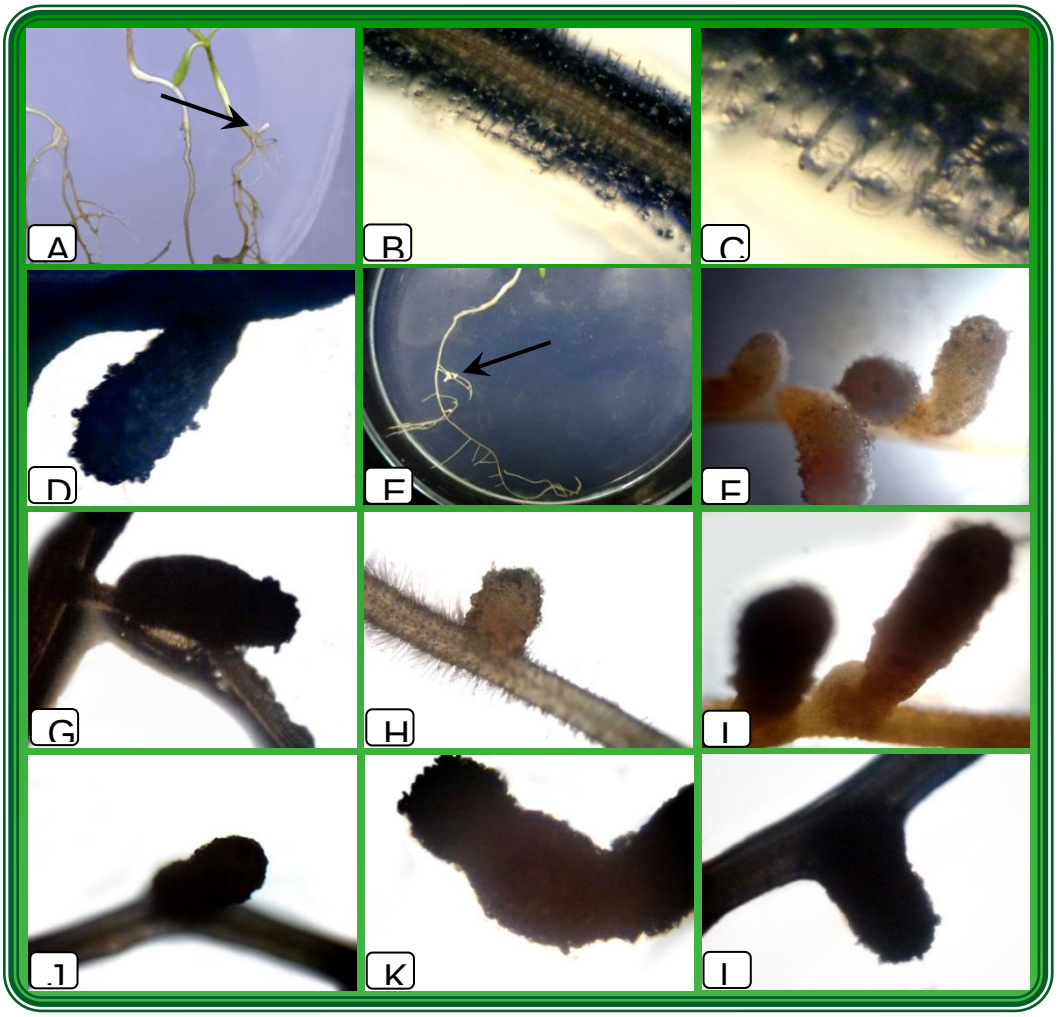
والذي ظهر واضحا في اختلاف اعداد الأفرع الخضرية والتي تراوحت ما بين (2–4) أفرع للنباتات المكونة للعقد ، مما أدى الى ارتفاع المحتوى البروتيني في المجموع الخضري للبادرات الملقحة بهذه البكتريا الذي سجل (4.3، 4.1، 4.7،2.5) ملغم/غم على التعاقب.

الجدول (6) العقد الجذرية لاصناف بادرات الجت *M. sativa* الملقحة ببكتريا (Rh4) *S. meliloti*

أصناف الجت	عدد البادرات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	% للنباتات المكونة للعقد	موقع العقدة على الجذر	شكل العقدة	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل ارتفاع المجموع الخضري (سم)
العراقي	17	3	68	الرئيسي	متطاول	4	8.0
البلجيكي	15	2	60	الرئيسي	متطاول	3	6.7
الباكستاني	11	1	44	الرئيسي	شبه كروي	2	5.5
الأمريكي	15	2	65	الرئيسي	متطاول	3	7.0

*** معدل عدد البادرات 25 بادرة/ معاملة**

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



الشكل (2) العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت *M.sativa*(باصنافه الاربعة) الملقحة بعزلات بكتريا *S. melilloti* (Rh4, Rh2) على التعاقب.

H-A. العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh2)

A. العقدة الجذرية المتطاولة (الجزء المؤشر) المتكونة على بادرات الجت (الصنف الباكستاني) بعمر اسبوعين

B. الشعيرات الجذرية المشوهة .

C. جزء مكبر عن الشعيرات المشوهةالمؤشرة في(B).

D. العقد الجذرية المتطاولة المتكونة على الجذرالرئيس لبادرة الجت (الصنف الباكستاني).

E. ا العقد الجذرية (الجزء المؤشر) المتكونةعلى الجذور الجانبية لبادرات الجت(الصنف البلجيكي).

F. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصنف البلجيكي.

G. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الجانبي للصنف الامريكي.

H. العقد الجذرية الاقرب للكروي الناضجة (40×) على الجذر الرئيسي للصنف العراقي.

L-I. العقد الجذرية المتكونة على اصناف بادرات الجت الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh4)

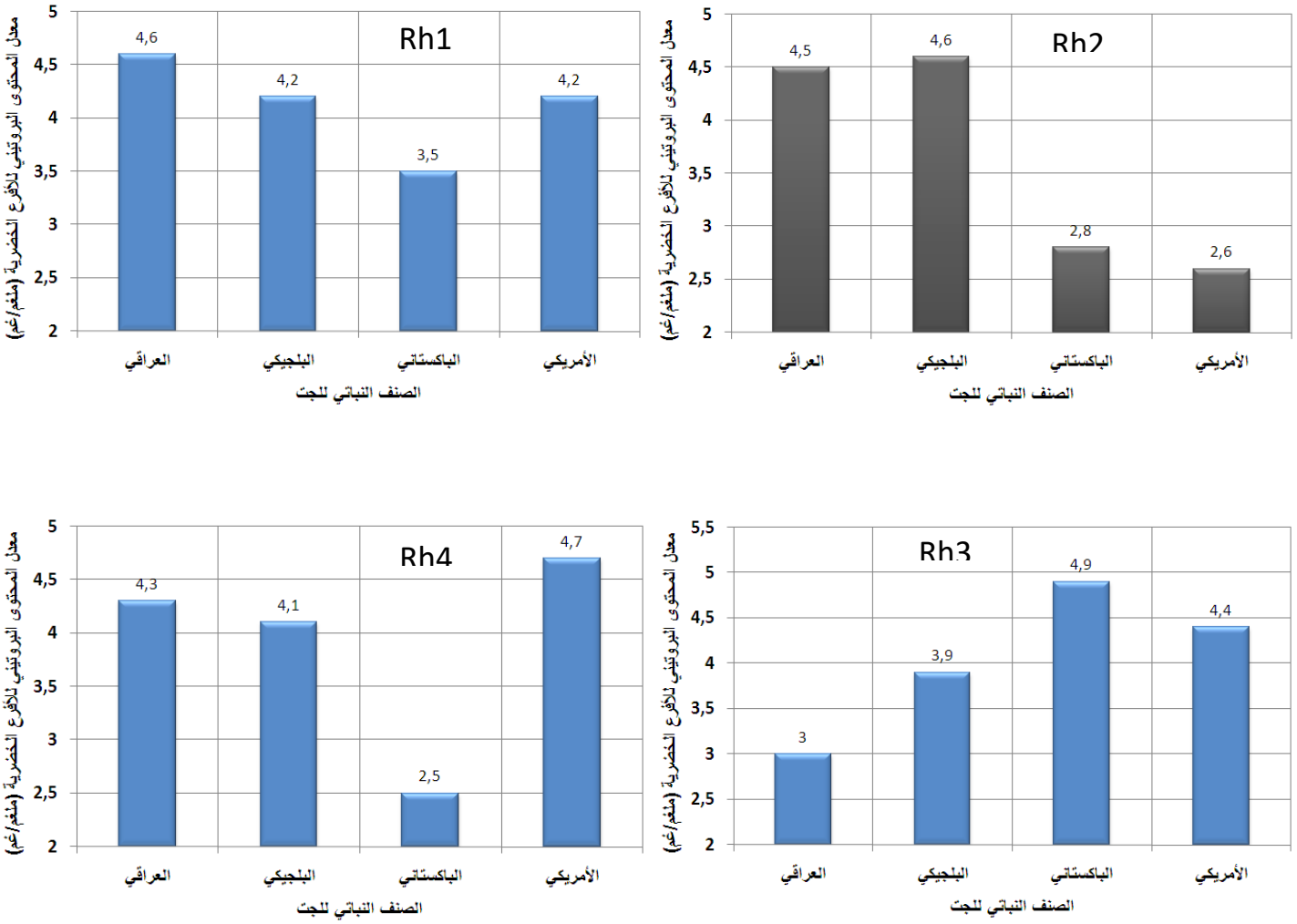
I. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف الامريكي.

J. العقدة الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف العراقي.

K. العقد الجذرية المتطاولة الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف البلجيكي.

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

L. العقد الجذرية شبه الكروية الناضجة (40×) على الجذر الرئيس للصنف الباكستاني



الشكل (3) يوضح تباين المحتوى البروتيني للمجموعةالخضرية لاصناف الجت الملقحة بعزلات بكتريا (*S. meliloti i*) Rh4, Rh3, المختلفة Rh2 , Rh1

5.3.1.3 تحديد كفاءة عزلات *S. meliloti* المعزولة على تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني لاصناف نباتات الجت الاربعة

ان اعداد العقد المتكونة على بادرات الجت باصنافه الاربعة والتي تباينت مع اختلاف السلالة المستعملة في التلقيح تعد من الامور المهمة في تقييم السلالة الاكفأ مع التراكيب الوراثية للصنف النباتي المستعمل، وان اعتماد النسبة المئوية للعقد المتكونة بفعل كل سلالة يُعد عاملاً رئيسياً في تحديد كفاءة السلاله ,اذ تم التوصل الى انتخاب العزلات العالية الكفاءة في تكوين العقد الجذرية على جذور بادرات الجت باصنافه الاربعة الجداول (3–6) مع تباين كفاءة هذه العزلات الجدول (7).

واختلاف قابليتها في تثبيتها للنتروجين الجوي الذي ظهر واضحاً في تسجيل أعلى معدل لتكوين العقد في السلالة (Rh1) تلتها السلالة (Rh2) وبنسب (68، 64)% على التوالي،وتلتها بقية العزلات، مما انعكس على معدل ارتفاع عدد العقد/بادرة الذي تراوح مابين (2–3.25) وارتفاع المحتوى البروتيني للبادرات الملقحة ورافقه ارتفاع معدل عدد الافرع الخضرية فيها ,و يعود نجاح تحقيق هذه العلاقة

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

بين طرفي العلاقة التعايشية لتبادل طرفي العلاقة التعايشية للدلائل الجزئية التي تتمثل بافراز جذور النبات البقولي للمركبات الفلافونيدية Flavonoids [30] التي تفرزها الشعيرات الجذرية لنباتات الجت لتحث الجينات المتخصصة للمضيف النباتي Host specific nodulation genes على التشفير لانتاج عوامل تكوين العقد Nod factor [31] الذي يربط جزءها الكايتيني بشكل متخصص بلكتين الجت الذي له دور مهم للارتباط ببكتريا الرايزوبيا بالارتباط بعوامل تكوين العقد المتخصص مؤدياً الى تشويه الشعيرات الجذرية التي تعد المداخل الرئيسية التي تتخذها بكتريا الرايزوبيوم وذلك بارتباطها بها بنوع من البروتينات التي تفرزها هذه الشعيرات [32,33]. لتنتهي بانقسام خلايا القشرة، ولتكوين العقد الجذرية بنسب واشكال متباينة ما بين (المتطاولة والاقرب الى الكروي، والمتفرعة) فضلا عن اختلاف المحتوى البروتيني للعينات باختلاف العزلة المستخدمة في التلقيح مع تباين الصنف للمضيف النباتي, وذلك لان العلاقة التعايشية تتوقف على عوامل حيوية تتعلق بكل من النبات والبكتريا ومقدار استجابة كل منهما للاخر في اثناء العلاقة المشتركة وربما يعود ذلك الى اختلاف نوع الفلافونيدت المفرزة من الشعيرات الجذرية للانماط الوراثية المختلفة للجت كفلافونيد Luteolin و Quercetin و Chrysoeviol لكونها تؤثر في انتاج عوامل تكوين العقد Nod factor من قبل *S. meliloti* [34] ولتأثيره المحفز في كونه يعمل عامل جذب كيميائي يزيد من نسبة ارتباط بكتريا الرايزوبيوم بالشعيرات الجذرية لنبات العائل البقولي المتخصص مما يترتب عليه زيادة أعداد العقد المتكونة على هذه النباتات [35].

الجدول (7) كفاءة عزلات بكتريا *S. meliloti* (Rh1, Rh2, Rh3, Rh4) في تكوين العقد الجذرية والمحتوى البروتيني لبادرات اصناف بادرات الجت *M. sativa* L

العزلة البكترية	% للنباتات المكونة للعقد	معدل عدد العقد/نبات	عدد الأفرع الخضرية/نبات	معدل المحتوى البروتيني (ملغم /غم)
Rh1	%68	3.25	4.50	4.10
Rh2	%64	2.75	4.20	3.60
Rh3	%58	2.75	3.75	4.05
Rh4	%59	2.00	3.00	3.90

6.3.1.3 التأكد من كفاءة البكتريا المعزولة من العقد الجذرية المتكونة على جذور بادرات الجت

تبين من عزل العقد المتكونة على جذور بادرات الجت بأصنافه الاربعة (العراقي، البلجيكي، الباكستاني، الامريكي) الملقحة ببكتريا *S. meliloti* (Rh_4, Rh_3, Rh_2, Rh_1) المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الجت الحقلية بعد التأكد من كفاءة تعقيمها بنموها على الوسط YEM الصلب وقدرتها على تكوين العقد الجذرية على بادرات الجت مرة ثانية.

المصادر :

[01] Sprent,J .I.,Evoltion and diversity of legume symbiosis in Dilwrth, M. J., James E.K., Sprent J. I., Ne wtong W.E.(eds.) Nitrogen fixing leguminous.Netherlands,pp.1-18, (2008).

[02] Mayouf, Mahmoud Ahmed. (1982). Introduction to legumes in Iraq. Mosul University Press, Iraq.

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

[03] Lewise,G.;Schrive,B.;Mackinder,B.and Lock,M.,Legumes of the World Royal Botanical Gardens.,Kew,UK.,(2005).

[04] Martinez, J.H.; Leonard, W.H. and Stamp, L.D. ,Principles of Field Crop Production. Third Ed. MacMillan Publishing Co. Inc., N.Y. USA., pp. 621-644, (1976).

[05] Crespi ,M.and Galvez, S., Molecular mechanisms in root nodule development. J. Plant Growth Regulation, 19: 155–166, (2000) .

[06] Graham,P.H.,Ecology of the root nodule bacteria of legumes.in: Dilworth.M.J.,James.S.K.,Sprent J. I., Newton, W. E. (eds.) Nitrogen- Fixing leguminous symbioses. Springer. Dardrecht. The Netherlands, PP.23-43, (2008).

[07] Udvardi, M. k.and Day, D.A.,Metabolite transport across symbiotic membrances of legume nodules. Ann. Rev. Plant Physiol.,48:493-523, (1997).

[08] Al-Mallah, M. K. ; Davey, M. R. and Cocking, E. C.,Enzymatic treatment of clover root hairs removes a barrier to *Rhizobium*-host specificity. Biot ., 5: 1319-1322, (1987).

[09] Valerie, O. and Sharon, R. L., Bacterial genes induced the nodule during the *Rhizobium* legume symbiosis. Molecu. Microbiol., 32(4):837-849, (1999) .

[10] Skinner, F. A.; Roughley , R.J. and Chandler, M.R., Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion in *Rhizobium spp*. J. Appl. Bacteriol., 43: 287-297, (1977).

[11] Schwedock, J. S.; and Long S. R., *Rhizobium meliloti* genes involved in sulfate activation: The two copies of Nod PQ and a new locus.J.Gene., 132: 899-909, (1992).

[12] Swamynathan, S. K.and Singh,A.;Pleiotor, P., Effects of purine auxotrophy in *Rhizobium meliloti* on cell surface molecules. J. Biosci., 20:17-28, (1995).

[13] Moore, L.W.; Kado, C.I. and Bouzar, H.,*Agrobacterium*. In Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. by Schaad, N.W. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn. pp. 16–36, (1988).

[14] Al-Qasimi, Alia Hazem Abdul-Razzaq, Biological activity of polysaccharides extracted from bacteria *S.meloti* on root ganglia formation, callus development and cell divisions of suspenstion cells of fenugreek seedlings *Trigonella foenum- graecum*, Master Thesis, College of Education, University of Mosul, Iraq, (2006).

[15] Fahraeus,G., The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass slide technique. J.Gen. Microbiol., 16:374-381, (1957).

[16]AL-Mullah, Muzahim Qasim; Al-Barhawi, Najwa Ibrahim, Inventing a new technique for the formation of atmospheric nitrogen-fixing nodes in wheat, barley and tomato by natural *Rhizobium*, patent 3914, Central Organization for Standardization and Quality Control, (2000).

[17] Lowry,O.H.;Roisebrough,N.J.;Farr,A.L.and Radad,R.J.,Protein measurment with folin phenol reagent. J. Bio.Chem.,193: 257-265. (1951).

[18] Schacterle,G.R.,and Pollack,R.L., A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. Anal.Biochem.sl:654-655, (1973).

[19] Kersters, K.and Deley J.,*Agrobacterium* conn 1942 . In: Kreig N.H.,Holt J.G. (eds.) Berey's Manual of Systematic Bacteriology , 19 :244-254 Williams and wilkins, Baltimor, USA ,(1984).

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

[20] Bano, A and Erum, S., Variation in phytohormore, production in *Rhizobium* strains at different Alttudes of Northern areas of Pakistan.International Journal of Agriculture & Biology, 10:526-540, (2008).

[21] Wood,P.J., Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. Carbohydr. Res., 85:271-287. (1980).

[22] Germia,R.A.;Cavaignae,S.; Zorrequieta,A.; Toro,N.; Olivares,J.and Ugalde,R.A., A *Rhizobium meliloti* mutant that forms in effective pseudo nodules in alfalfa produces exopolysacctavides but fails to form B(1 -2) gluca.J.bacteriol.,169:880-884, (1987).

[23] Ames,P. and Bergman,K.,Competitive advantage prodived by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*.J.Bac.,148: 728-729, .(1981).

[24] Bohcompagni,E.; Trinchant,J.C.; Spennato,G.; Poggi; M.C and Le Rudulier, D.,The *sinorhizobium mililoti* glycine betaine biosynthetic genes (beticba) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. Mol.plant-Microbe Int.,16:709-719, .(2003).

[25] Price,G.D.;Mohapatra,S.S .and Gresshoff, D.M., Strucutre of nodules formed by *Rhizobium strain* ANU289 on the lhe non- legume *Parasponia* and the legume siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Bot.Gaz.,145:444-451, (1984).

[26] Whittam,T.S.,Sex In Soil.Current Biology, 2:676-678, .(1992).

[27] Bhuraneswar, T.V; Andrew,P;Lesniak and Wolfgang,D.B., Efficiency of nodule Initiation in cowpea and soybean. P. Phy Sci.,86:1210, (1988).

[28] Horrath,B. C.; Bachem , J. W.;XSchell, J .and Kondorosi. A.,Host specific regulation of nodulation gene in *Rhizboium* is mediated by a plant signal, interacting with the nod D gene product.EMBO J. 6:841-848, .(1987).

[29] Fentahun,M.; Akhtar, M. S. and Diriba, M., Isolation and characterization of nitrogen deficit *Rhizobium* isolates and their effect on growth of haricot bean. Aacdemic Journal, 8 :5942-5952, (2013).

[30] Wojtaszek ,P.;Stobiecki, M.and Gulewicz, K.,Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of intact white lupin (*Lupinus albus* L) plants. J.Plant Physiol., 142:689-694, (1993).

[31] Long,S.D., *Rhizobium* symbiosis: Nod Factors in perspective. The Plant Cell,8: 1885-1898, (1996).

[32] Daneil,P.M.; Marica,L.; Socorro,M.; Jose,A.; Jose,O.; Fernando,C.and Juan, S., The relaxase of the *Rhizobium etli* symbiotic Plasmid shows hie site cis-acting preference. J.Bacteriol.,188:7488-7499. (2006).

[33] Paez-valencia, J. P. ; Gomez, C. S.; Mayoral P. V.; Ramos A. C.; Lucas, I. H.; Segovia, A. O. and debuen, A. G. , Localization of the MADS domain transcriptional factor NMH7 during seed, seedling and nodule development of *Medicago sativa*. Plant Science., 175: 596-603, (2008).

[34] Cardenaus, L.; Dominguez, J.; Quinto, C.; Lopez-Lava, L Lugtenber, B.; Spaink, H; Rademaker, G; Haverkamp,J. and Thomas-Oates, J.,Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide, nodulation signals from *Rhizobium etli*.Plant Mol.Biol.,29: 453-464, (1995).

[35] Long,S.R., *Rhizobium*-Legume nodulation: life together in the underground. Cell, 56:203-214, (1989).

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